

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Identifizierung, Validierung und
funktionelle Charakterisierung spezifischer
Tumormarker für Karzinome des Kopf-
Hals-Bereiches**

Jens Rauch

aus

Volkmarsen

München, 2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler betreut und von Herrn Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 27.01.2006



.....
(Jens Rauch)

Dissertation eingereicht am 27.01.2006

1. Gutachter Herr PD Dr. Reinhard Zeidler

2. Gutachter Herr Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 29.09.2006

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Manuskripte publiziert oder zur Publikation eingereicht:

1. Gires, O., Münz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., **Rauch, J.**, Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W. and Zeidler, R. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1198-1207.
2. **Rauch, J.**, Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., Andratschke, M., Zeidler, R., Lang, S. and Gires, O. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 156-162.
3. Gires O., Mack B., **Rauch J.** and Matthias C. (2006) CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun*, **343**, 252-9.
4. Schaffrik M., Mack B., Matthias C., **Rauch J.** and Gires O. (2006) Molecular Characterization of the tumour-associated antigen AAA-TOB3. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 2162-2174.
5. **Rauch, J.**, O'Neill, E., Mack B., Kölch W., Gires, O. hnRNP H prevents apoptosis via regulation of A-Raf splicing and inhibition of the MST2 tumor-suppressor pathway. *Manuskript in Vorbereitung*.
6. **Rauch, J.**, Mack B., Gires, O. Specific cleavage and post-translational modification of the hnRNP H protein. *Manuskript in Vorbereitung*.

für Nora

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. TUMORE DES KOPF-HALS-BEREICHES	1
1.1.1. <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2. <i>Prognose</i>	2
1.1.3. <i>Karzinogenese</i>	3
1.1.4. <i>Diagnose und Therapie</i>	5
1.2. IMMUNOGENITÄT VON TUMOREN UND TUMORANTIGENE	6
1.2.1. <i>Tumorantigene bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches</i>	9
1.3. TECHNIKEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN	9
1.4. ZIELSETZUNG.....	13
2. MATERIAL	14
2.1. CHEMIKALIEN, VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	14
2.1.1. <i>Sonstige Chemikalien</i>	14
2.1.2. <i>Verbrauchsmaterialien</i>	16
2.1.3. <i>Geräte</i>	16
2.1.4. <i>Dienstleistungen</i>	17
2.2. ANTIKÖRPER.....	17
2.3. BAKTERIEN	18
2.4. PLASMIDE	18
2.5. ZELLINIEN.....	19
2.6. OLIGONUKLEOTIDE	20
2.6.1. <i>Primer</i>	20
2.6.2. <i>siRNAs</i>	21
3. METHODEN.....	22
3.1. ZELLKULTUR	22
3.1.1. <i>Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien</i>	22
3.1.2. <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	22
3.1.3. <i>Berechnung der Verdoppelungszahl</i>	23
3.1.4. <i>Generierung von Zelllysaten</i>	23
3.2. IMMUNPRÄZIPITATION UND 2D-ELEKTROPHORESE (ALLO-AMIDA).....	23
3.2.1. <i>Immunpräzipitation</i>	23
3.2.2. <i>Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)</i>	24
3.2.3. <i>Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	25
3.3. MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION TIME-OF-FLIGHT ANALYSE (MALDI-ToF).....	26
3.3.1. <i>Tryptischer Verdau</i>	26
3.3.2. <i>Konzentrierung des tryptischen Verdau / Kristallisierung auf Anker-Metallplatten</i>	27

3.3.3.	MALDI-ToF Analyse	27
3.4.	IN-SITU HYBRIDISIERUNG.....	28
3.5.	IMMUNHISTOCHEMISCHE SCHNITTFÄRBUNGEN	28
3.6.	IMMUNZYTOCHEMIE	29
3.7.	ZYTOSPIN.....	29
3.8.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	29
3.8.1.	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.8.2.	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	30
3.9.	BAKTERIENKULTUR.....	31
3.9.1.	Vermehrung und Aufbewahrung.....	31
3.9.2.	Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.10.	TRANFEKTION EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	31
3.11.	WESTERN BLOT	32
3.12.	FACS-ANALYSEN	32
3.12.1.	Quantifizierung der Transfektionseffizienz	32
3.12.2.	Propidiumiodid-(PI)-FACS-Analyse	32
3.12.3.	Annexin-V-Analyse.....	32
3.13.	MTT ASSAY (MOSMANN, 1983).....	33
3.14.	GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS MICROARRAY	33
3.15.	KO-IMMUNPRÄZIPITATION	34
3.16.	KINASE-AKTIVITÄTS-ASSAY	34
4.	ERGEBNISSE.....	35
4.1.	IDENTIFIZIERUNG UND VALIDIERUNG NEUER HUMORALER TUMORANTIGENE IN PLATTENEPITHELKARZINOMEN DER OBEREN ATEMWEGE.....	35
4.1.1.	Weiterentwicklung der AMIDA-Technologie zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen (allo-AMIDA)	35
4.1.2.	Isolierung und Identifizierung potenzieller neuer Tumorantigene.....	41
4.1.3.	Validierung der Tumorantigene Grb2, Hsp27, BiP und hnRNP H.....	43
4.1.4.	Expressionsprofile des potenziellen Tumorantigens hnRNP H.....	48
4.2.	FUNKTIONELLE ANALYSEN DES TUMORANTIGENS hnRNP H	51
4.2.1.	Etablierung eines zellulären Systems zur funktionellen Untersuchung von hnRNP H.....	52
4.2.2.	Auswirkungen der hnRNP H-Repression auf Zelldichte, Zellzahl und Vitalität	55
4.2.3.	hnRNP H-Repression induziert Apoptose in Karzinomzelllinien	60
4.2.4.	Transkriptomanalyse der siRNA-induzierten hnRNP H-Repression.....	65
4.2.5.	ARAF1 interagiert mit MST2 und inhibiert dessen Kinaseaktivität.....	73
4.2.6.	Proteomanalyse der siRNA-induzierten hnRNP H-Repression.....	75
4.3.	UNTERSUCHUNGEN ZUR POSTTRANSLATIONALEN MODIFIKATION VON hnRNP H	76
5.	DISKUSSION	82
5.1.	WEITERENTWICKLUNG DER AMIDA-TECHNOLOGIE ZUR ALLO-AMIDA-TECHNOLOGIE	82
5.2.	IDENTIFIZIERUNG VON TUMORANTIGENEN DES KOPF-HALS-BEREICHES MITTELS ALLO-AMIDA	87

5.3.	VALIDIERUNG DER ALLO-AMIDA-ANTIGENE.....	89
5.4.	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES ALLO-AMIDA ANTIGENS hnRNP H	92
5.4.1.	<i>Die Repression von hnRNP H führt zu Apoptose.....</i>	95
5.4.2.	<i>Potenzielle Targets von hnRNP H.....</i>	96
5.4.3.	<i>Modifikationen von hnRNP H.....</i>	101
5.5.	IST hnRNP H EIN GEEIGNETER TUMORMARKER ODER EINE ZIELSTRUKTUR FÜR THERAPIEN?	101
5.6.	AUSBLICK	104
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	107
7.	LITERATURVERZEICHNIS	109
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	119
9.	DANKSAGUNG	123
10.	LEBENS LAUF.....	124

1. Einleitung

Jedes Jahr werden mehr als 11 Millionen Menschen weltweit mit der Diagnose Krebs konfrontiert. Mehr als 7 Millionen Menschen sterben jährlich an dieser Erkrankung. Man schätzt, dass bis zum Jahr 2020 die Zahl der Neuerkrankungen vermutlich jährlich auf über 16 Millionen ansteigen wird (Boutayeb, 2005; <http://www.who.int/cancer/en/>).

Weltweit ist Krebs für 12% aller Todesfälle verantwortlich. In den Industrieländern ist Krebs mit 25% die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aufgrund der Erfolge, die bei der Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erreicht werden und des Anstiegs der durchschnittlichen Lebenserwartung, wird Krebs voraussichtlich bald die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern sein.

Die Ursachen der Krebsentstehung sind äußerst komplex und nahezu jede Tumorerkrankung stellt ein individuelles Problem dar. Damit erweist sich die Tumorbekämpfung als besonders schwierig. Trotz intensiver Krebsforschung in den letzten Jahrzehnten und des technischen und wissenschaftlichen Fortschritts in Diagnose und Therapie ist es nur bei einigen Krebsentitäten gelungen, die Mortalität signifikant zu senken. Dazu zählen die Bekämpfung von Melanomen, Brust- und Hodenkrebs, die mit ihren sehr guten Heilungschancen auf die Möglichkeit der Bekämpfung weiterer Tumorentitäten hoffen lassen.

Die wichtigsten Voraussetzungen zur Bekämpfung von Krebsleiden sind eine optimale Früherkennung und eine differenzierte, individuelle und somit gezielte und erfolgversprechende Therapie.

1.1. Tumore des Kopf-Hals-Bereiches

Aufgrund der Einbindung der Arbeitsgruppe in die Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München orientiert sich die Forschung im Wesentlichen an Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches.

1.1.1. Epidemiologie

Tumore in der Kopf-Hals-Region gehören mit einer jährlichen globalen Inzidenz von über 500.000 zu den häufigsten Krebsentitäten. Weltweit stehen sie an sechster, bei Männern sogar an fünfter Stelle der Häufigkeiten (American Academy of Otolaryngology, www.entnet.org,

2005). Die bei weitem bedeutendsten Risikofaktoren sind Rauchen und Alkoholkonsum (siehe Übersicht in Hunter *et al.*, 2005). Ein Anteil von ca. 75% dieser Tumore geht auf diese beiden Riskofaktoren zurück (Boyle *et al.*, 1995). Der Konsum von Tabak ist mit einem 20-fach erhöhten Risiko assoziiert, Alkohol mit einem 5-fach erhöhtem Risiko, an einem Tumor des Hals-Rachenraums zu erkranken. Die Kombination von gesteigertem Tabak- und Alkoholkonsum führt zu einem 50-fach erhöhtem Erkrankungsrisiko (Rodriguez *et al.*, 2004). Die kanzerogenen bzw. pro-kanzerogenen Inhaltsstoffe des Tabaks, wie Benz-(a)-pyren oder Nitrosamine, verursachen im Genom Punktmutationen hauptsächlich durch Guanin-Nukleotid-Transversionen (Brennan *et al.*, 1995; Hecht, 2003). Gesteigerter Alkoholkonsum wird als ko-kanzergener Risikofaktor angesehen. Alkohol wird zu Acetaldehyd metabolisiert und kann in dieser Form zu DNA-Schäden führen sowie Glutathion abfangen, das ein wichtiges Peptid bei der Detoxifizierung von Karzinogenen ist (zur Übersicht siehe Poschl and Seitz, 2004; Seitz *et al.*, 2001). Außerdem induziert Alkohol das Cytochrom p450 Enzym CYP2E1, das an der Aktivierung verschiedener Prokarzinogene beteiligt ist (Poschl and Seitz, 2004).

Neben diesen Hauptrisikofaktoren gibt es eine Reihe erwiesener und vermuteter Faktoren, die eine synergistische Rolle in der Karzinogenese spielen. Dazu zählen u.a. Ernährungsfaktoren und Virusinfektionen durch das humane Papillomavirus (HPV) (de Villiers *et al.*, 1985), Epstein-Barr-Viren (EBV) (Hildesheim and Levine, 1993) bzw. Herpes-Simplex-Viren (HSV) (Kumari *et al.*, 1987). Onkogene Virusproteine, wie die HPV-Proteine E6 und E7, können außerdem Schlüsselproteine in wichtigen Kontrollmechanismen der Zellproliferation und Apoptose (z.B. p53) inaktivieren und somit die Karzinogenese vorantreiben (Braakhuis *et al.*, 2004). Als weitere Riskofaktoren gelten die berufsbedingte Exposition von Farben, Lacken, Asbest- und Zementstäuben. Medizinische Faktoren wie schlechte Mundhygiene werden diskutiert (Hunter *et al.*, 2005).

1.1.2. Prognose

Trotz des Fortschritts in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie hat sich die Prognose für maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches nicht verbessert (Kastenbauer and Wollenberg, 1999). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt durchschnittlich 50% und gehört somit zu den schlechtesten unter den häufigsten Tumorarten.

Eine Ursache für diese schlechte Prognose ist der Zusammenhang von Tumorstadium und dem Ausmaß der Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. So können Patienten mit einem Karzinom in frühem Stadium (Stadium I: Primärtumor in der längsten Ausdehnung

≤ 2 cm) mit einer durchschnittlichen 5-Jahres Überlebensrate von 85% rechnen. Bei Patienten mit Tumoren von großer lokaler Ausdehnung und zusätzlichem Befall von Lymphknoten reduziert sich die Überlebensrate durchschnittlich auf 30% (Lang *et al.*, 2002). Als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei Erstdiagnose gilt die lymphogene Metastasierung. So reduziert sich die Überlebensrate bei Anwesenheit einer einzigen Lymphknotenmetastase (LKM) um mindestens 50% (Enepekides *et al.*, 1999).

Patienten mit LKM entwickeln nach abgeschlossener Therapie mit höherer Wahrscheinlichkeit Rezidive und Fernmetastasen in anderen Organen (vorwiegend Lunge und Skelettsystem), die zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit und zu dieser äußerst schlechten Prognose führen. Lokoregionäre Lymphknoten werden routinemäßig histologisch auf disseminierte Tumorzellen überprüft. Einige Studien konnten zeigen, dass bis zu 80% dieser als tumorfrei diagnostizierten Lymphknoten, die während der OP oder bei Nachuntersuchungen entnommen werden, tatsächlich doch Mikrometastasen enthalten (Rinaldo *et al.*, 2004). Diese okkulten Tumorzellen sind eine Ursache für die sog. *minimal residual disease* (MRD), sind mit routinemäßigen histopathologischen Methoden unzureichend detektierbar und bilden aufgrund der Progression dieses Karzinomtyps schnell Rezidive und weitere Metastasen.

Die schlechte Prognose bei malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches hat sich in den letzten 40 Jahren kaum geändert. Zur Verbesserung dieser schlechten Prognose sind zuverlässige biologische Marker notwendig, die zu einem frühen Zeitpunkt mit dem Tumor assoziiert und somit für eine routinemäßige Frühdiagnose geeignet sind. Molekulare Marker könnten außerdem Zielstrukturen für neue Therapieformen darstellen. Bisher sind jedoch nur sehr wenige geeignete molekulare Biomarker verfügbar.

1.1.3. Karzinogenese

Die Karzinogenese, also die Entstehung von Tumoren, ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der auch zum heutigen Stand der Forschung nicht vollständig verstanden ist (Hanahan and Weinberg, 2000). Die einzelnen Stufen reflektieren genomische Veränderungen, die der Zelle einen Selektionsvorteil verschaffen. Eine einzige genetische Veränderung ist für die progressive Transformation normaler humaner Zellen in maligne Tumorzellen nicht ausreichend (Hahn *et al.*, 1999). Erst die sequenzielle Akkumulation verschiedener genomischer Alterationen im Verlauf der Tumorentstehung führt letztendlich zu einer unkontrollierten zellulären Expansion. Dieses Modell der Tumorentstehung wird formal mit der Darwinschen Evolutionstheorie verglichen. Eine Abfolge genetischer Veränderungen resultiert jeweils in einem Wachstumsvorteil, die schließlich in der Konversion einer normalen humanen Zelle in

eine Tumorzelle resultiert (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Als Krebs bezeichnet man die Endstufe dieses Prozesses, der sich über einen Zeitraum mehrerer Jahrzehnte erstrecken kann. Krebs ist durch zwei Haupteigenschaften charakterisiert: unkontrollierte Zellproliferation und die Fähigkeit der Krebszellen, in umliegende Gewebe einzudringen. Nach Hanahan und Weinberg (2000) werden folgende sechs physiologische und molekularbiologische Voraussetzungen als essentiell für die Aufrechterhaltung des malignen Zellwachstums postuliert: 1. die Induktion autokriner Wachstumssignale, 2. die Resistenz gegenüber Apoptose, 3. der Verlust der Sensitivität gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen, 4. eine verstärkte Angiogenese, 5. die Gewebeinvasion und Metastasierung und 6. ein uneingeschränktes proliferatives Potential (Hanahan and Weinberg, 2000).

Im Rahmen dieser physiologischen Prozesse spielen drei Klassen von Genen eine entscheidende Rolle: Proto-Onkogene, Tumor-Suppressor-Gene und Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Vogelstein *et al.*, 2000).

Als Proto-Onkogene werden Gene bezeichnet, deren Genprodukte bei vermehrter Bildung und Aktivierung zu abnormem Zellwachstum bzw. zur Karzinogenese führen. Eine Verstärkung ihrer Funktion wird als „gain of function“ bezeichnet und kann durch Genmutation, chromosomale Translokation, Genamplifikation oder retrovirale Insertion hervorgerufen werden. Als klassische Beispiele gelten Transkriptionsfaktoren (c-Myc, Fos, Jun, c-Myb), Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, EGF-R, c-erb-2/HER-2, Hst-1, Int-2), intrazelluläre Signalüberträger (Ras, Raf, STAT-3), Zellzykluskontrollproteine (Cyclin D1) und Proteine, die in der Apoptose involviert sind (Bcl-2, Bax) (Vogelstein *et al.*, 2000).

Mutationen der Tumor-Suppressor-Gene und DNA-Reparatur-Gene dagegen resultieren oft in der Inaktivierung der Funktion und werden als „loss of function mutation“ bezeichnet (Hanahan and Weinberg, 2000). Prominenteste Beispiele für Tumor-Suppressor-Gene sind p53, das Retinoblastoma Tumor-Suppressor-Protein Rb sowie p16^{INK4a}. p53 ist nicht nur für den Erhalt der genomischen Stabilität wichtig, sondern spielt darüber hinaus auch eine wichtige Rolle im Fortschreiten des Zellzyklus, der zellulären Differenzierung, DNA-Reparatur und Apoptose (Levine, 1997). Erhöhter Konsum von Tabak kann zu p53 Mutationen als frühes Ereignis in der Karzinogenese führen (van Oijen *et al.*, 1999). Ein weiteres Schlüsselergebnis in der Karzinogenese von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist die Deletion bzw. Inaktivierung von p16. p16 verhindert die Interaktion von CDK4 und CDK6 mit Cyclin D und fungiert somit als negativer Proliferationsregulator in der Zelle. Die Abwesenheit von p16 führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation (Liggett and Sidransky, 1998).

Etwa 95% aller Wucherungen im Kopf-Hals-Bereich sind Tumore epithelialen Ursprungs (Gath and Brakenhoff, 1999). Karzinome des Hals-Rachen-Bereiches bzw. der oberen Atemwege gehören zur Gruppe der Plattenepithelkarzinome. Die häufigsten Karzinome der oberen Atemwege sind Wucherungen in der Mundhöhle, in den Nasenhohlräumen, des Kehlkopfs (Larynx), des Pharynx mit Oropharynx, Hypopharynx und Laryngopharynx oder des Ösophagus.

Bei malignen Erkrankungen der oberen Atemwege erfolgt die Karzinogenese ausgehend vom gesunden Epithel über die Hyperplasie und Dysplasie zum *Carcinoma in situ*, und kann schließlich im invasiven Karzinom mit Metastasenbildung enden. Die Karzinogenese beginnt mit einzelnen epithelialen Zellen, die spezifische Alterationen aufweisen und ein erhöhtes Proliferationspotenzial aufweisen. Dieser Prozess geht einher mit der Zunahme der Zellgröße und einer Abnahme der Differenzierung. Die Basalzellschicht wird durchbrochen, entartete Zellen infiltrieren benachbartes Gewebe. Der Prozess endet mit dem Befall von Lymphknoten und anderer Organe.

Die Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumoren geht einher mit einigen spezifischen zytogenetischen Veränderungen. Von besonderer Bedeutung sind folgende drei Modifikationen, die sehr häufig im Verlauf der Tumorerkrankung nachgewiesen werden konnten: die Inaktivierung des zyklinabhängigen Kinaseinhibitors p16 (Chr. 9p21), Mutationen des Tumorsuppressor-Proteins p53 (Chr. 17p13) sowie die Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, epidermal growth factor receptor) (Chr. 7p11). Genetische Veränderungen dieser Loci und damit kodierter Gene konnten in respektive 40% (Taylor *et al.*, 1999), 70% (Sartor *et al.*, 1999), und 90% (Grandis and Tweardy, 1993) aller Karzinome der oberen Atemwege nachgewiesen werden.

1.1.4. Diagnose und Therapie

Ein besonderes Problem stellt die sehr späte Diagnose von malignen Erkrankungen des Hals-Rachen-Raumes dar. Die Symptomatik, wie Schluckbeschwerden, Atemnot und länger auftretende Heiserkeit, tritt bei diesen Tumoren erst zu einem späten Zeitpunkt auf. Die Tumore werden aufgrund ihrer Größe und des Vorhandenseins von Metastasen in verschiedene Stadien eingeteilt (TNM-Stadien). Mit T wird der Primärtumor bezeichnet und wird nach Größe und Invasivität in angrenzende Gewebe in die Stadien T1 bis T4 unterteilt (T1: kleiner Tumor, keine Umgebungsinfiltration; T4: sehr großer Tumor, ausgedehnte Infiltrationen). N beschreibt den Befall regionaler Lymphknoten (N0 bis N3), M steht für Metastasen in anderen Organen (Fernmetastasen; M0: keine Fernmetastasen nachweisbar; M1: Fernmetastasen

vorhanden). Im Bereich des Hals-Rachen-Raumes haben bei Erstdiagnose bereits zwei Drittel der Patienten weit fortgeschrittene Tumoren, d.h. Karzinome im Stadium T3 bzw. T4. Bei ca. 50-60% der Tumorpatienten liegen bereits bei der ersten Vorstellung lokoregionäre Metastasen vor (Vokes *et al.*, 1993). Eine regelmäßige Untersuchung und Kontrolle für das Auftreten von Tumoren und präkanzerösen Läsionen des Kopf-Hals-Bereiches erfolgt in aller Regel nicht. Eine regelmäßige Früherkennung, wie sie bei Cervix-Karzinomen (PAP-Abstrich), Mamma-Karzinomen (Mammographie) oder dem Prostata-Karzinom (PSA, prostate-specific antigen) durchgeführt wird, findet nicht statt. Bei Diagnose einer malignen Erkrankung des Kopf-Hals-Bereiches ist die bis heute wichtigste Therapiestrategie die operative Resektion des Primärtumors, teilweise in Kombination mit nachfolgender Bestrahlungs- oder Chemotherapie. Die Art der Behandlung ist abhängig vom Alter des Patienten sowie Art, Ausdehnung und Lokalisation des Tumors.

Trotz Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Therapiestrategien stellte sich in den letzten Jahren keine verbesserte Prognose ein. Seit einigen Jahren wird daher nach neuen und effektiven Wegen in der Diagnostik und Therapie gesucht. Eine überragende Rolle spielt dabei das Verständnis der molekularen und zellbiologischen Veränderungen im Tumor. Neue Informationen auf diesem Forschungsgebiet decken zunehmend neue Wege der Karzinogenese auf und weisen auf immer mehr Angriffspunkte für neue diagnostische und therapeutische Verfahren hin. Zuverlässige Biomarker können zu einer früheren Diagnose, einer besseren Überprüfung der Tumorprogression, der Identifizierung okkulten Tumorzellen und zu einer individuellen, gezielten Therapie führen.

1.2. Immunogenität von Tumoren und Tumorantigene

Als Biomarker werden Moleküle bezeichnet, die mit einem Risiko oder dem Vorkommen von Neoplasien assoziiert sind. Sie erlauben Aussagen über Wahrscheinlichkeit, Existenz, Progression und Prognose von Tumoren und können zudem selbst interessante Zielstrukturen für neue Therapiestrategien sein. Es lassen sich drei Klassen molekularer Biomarker unterscheiden: DNA-Marker, RNA-Marker und Protein-Marker (Sidransky, 2002). Als „DNA-Marker“ werden tumorassoziierte Mutationen, freie DNA z.B. in Plasma oder Urin, Hypermethylierungen von Promotorregionen, Mikrosatelliten-Instabilität oder Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity) und virale DNA bezeichnet. RNA-Marker sind erhöhte mRNA-Expressionen von Genen in Tumorzellen. Als Protein-Marker werden Proteine bezeichnet, die tumorspezifisch stärker exprimiert bzw. strukturell verändert synthetisiert werden. Diese kön-

nen sich sowohl innerhalb der Zellen befinden, als auch aktiv sezerniert bzw. durch Tumornekrose freigesetzt werden. Protein-Marker zeigen häufig immunogene Eigenschaften und werden dann als tumorspezifische oder -assoziierte Antigene (TA) bezeichnet. Antikörper oder andere Proteine, die der Organismus als Reaktion auf TAs bildet, werden ebenfalls als Protein-Marker bezeichnet.

Im Folgenden soll auf die Klasse der TA detaillierter eingegangen werden. Zunächst wird beschrieben, wie TA entstehen und warum diese Proteine häufig immunogene Eigenschaften besitzen (Spiotto *et al.*, 2003).

Tumorzellen sind körpereigene Zellen, die ein spezifisches Spektrum an Proteinen exprimieren. Ein Großteil dieser Proteine wird vom Immunsystem als „eigen“ erkannt und toleriert, da die Proteine in gesunden Zellen gleichermaßen exprimiert werden. „Fremd“ werden Proteine, wenn sie strukturell verändert sind, eine ektopische Lokalisation aufweisen oder aberrant exprimiert werden. Für das Immunsystem resultieren diese Veränderungen in unbekannten, immunogenen Peptiden, wodurch eine autologe Immunantwort ausgelöst wird (Neoantigene). Dieser Vorgang ist zudem abhängig von der vorliegenden Antigenkonzentration, der Kreuzpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APC, antigen-presenting cells) sowie von dem Reifungsgrad der APC (Spiotto *et al.*, 2003). Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, lassen sich TA in mehrere Klassen einteilen (Van den Eynde and van der Bruggen, 1997).

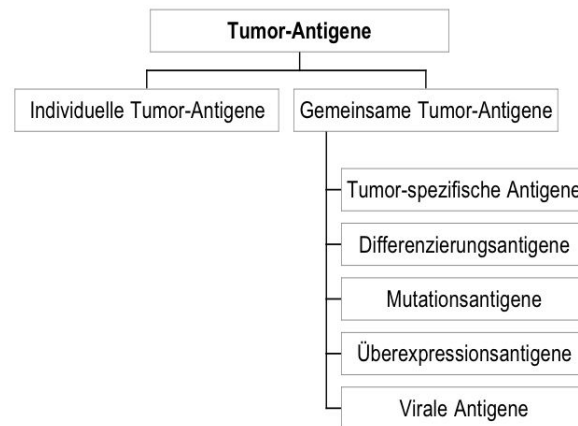


Abbildung 1.1: Klassifizierung von Tumor-Antigenen.

Generell werden zwei Arten von TAs unterschieden: TAs, die individuell in einem oder sehr wenigen Patienten aufgrund individueller Mutationen mit einer Tumorerkrankung auftreten (Individuelle TAs) und die sog. gemeinsamen TAs (STA, shared tumor antigens), die in einer Vielzahl von Tumorentitäten und Patienten gefunden wurden. Die Gruppe der STA lässt sich

anhand der Entstehung der TAs wiederum in fünf Untergruppen aufteilen (Van den Eynde and van der Bruggen, 1997).

Die sogenannten Tumor-spezifischen Antigene werden ausschließlich in Tumorzellen und nicht in gesunden Zellen exprimiert. Sie werden auch als Cancer-Testis Antigene (CTA) bezeichnet, da sie neben Tumorzellen nur in den immunprivilegierten Geweben Plazenta, Trophoblasten und Testis sowie während der Embryogenese exprimiert werden. In gesunden somatischen Zellen sind die Promotorbereiche methyliert, wodurch die Expression der Gene stark reprimiert ist. In Tumorzellen kommt es hingegen häufig zu Demethylierungen und somit zur Expression der CTAs, die dann immunogen wirken können. Beispiele für CTAs sind MAGE-A, NY-ESO-1 und CEA (zur Übersicht siehe Simpson *et al.*, 2005). Differenzierungsantigene werden in Tumoren und normal differenzierten Zellen exprimiert. Die Tyrosinase, ein Protein das für die Produktion von Melanin nötig ist, wird z.B. in gesunden Melanozyten und in Melanomzellen hergestellt (Brichard *et al.*, 1993). Vertreter dieser Antigengruppe werden von den meisten Tumoren gebildet, sind aber nicht tumorspezifisch, sondern tumorassoziiert. Die dritte Untergruppe der STA beinhaltet Antigene, die durch Mutationen entstanden sind. Dazu zählen tumorspezifische Punktmutationen und Leserastermutationen, wie sie bei p53 und CDK4 zu finden sind (Scanlan *et al.*, 1998; Mandruzzato *et al.*, 1997). Als weitere Ursachen für Mutationen gelten tumorspezifische Translokationen. Prominentestes Beispiel ist wohl das Fusionsprotein BCR-ABL bei den chronischen myeloischen Leukämien (CML) sowie akuter B-lymphoblastischer Leukämie (B-ALL) (Berke *et al.*, 2000). Die wahrscheinlich größte Gruppe der TA stellen die Überexpressions- und Amplifizierungsantigene. Es handelt sich um Proteine, die zwar in einigen Geweben gebildet werden, im Tumor jedoch deutlich überexprimiert sind. Man nimmt an, dass diese Überexpression zu einer erhöhten Präsentationsdichte von immunogenen Peptiden dieser TAs auf den Tumorzellen und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation durch APCs führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Immunantwort gegen diese hoch exprimierten, aber strukturell natürlichen Proteine (Spiotto *et al.*, 2003). Gelangen Antigene durch Sezernierung bzw. Ausschüttung nach Apoptose oder durch Streuung von Tumorzellen in drainierende Lymphknoten, können sie dort direkt zu einer Aktivierung von T- und B-Zellen führen. Beispiele für Überexpressionsantigene sind Her2/neu (Hynes and Stern, 1994), EpCAM (Litvinov *et al.*, 1996; Armstrong and Eck, 2003) und das Onkogen Ras (Medema and Bos, 1993). Antigene, die von onkogenen Viren stammen, stellen ebenfalls eine Kategorie von TA dar. Bei humanen Tumoren sind die Proteine E6 und E7 des humanen Papillomavirus 16 (HPV16) die bestuntersuchten Beispiele. Diese virusspezifischen Proteine finden sich in über 90% aller zervikalen Karzinome (Ressing

et al., 1995) und in ca. 30% der Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Klussmann *et al.*, 2001), wobei bis zu 52% der Oropharynxkarzinome und 64% der Tonsillenkarzinome HPV16-positiv sind (Ringstrom *et al.*, 2002).

Neben dieser klassischen Klassifizierung von TA werden seit einiger Zeit auch Proteine als TA diskutiert, die durch tumorspezifisches Spleißen von prä-mRNAs (Robbins *et al.*, 1997; Usener *et al.*, 2003), tumor-spezifische post-translationale Modifikationen (Mamula *et al.*, 1999; Pauli *et al.*, 2003) oder posttranslationales Proteinspleißen (Hanada *et al.*, 2004) entstehen.

Tumorspezifische Gene bzw. tumorassoziierte Proteine spielen im Rahmen von Diagnose und Therapie als Biomarker eine große Rolle. Sie ermöglichen z. B. die Visualisierung einzelner Tumorzellen im Rahmen von bildgebenden Verfahren. Werden TAs sezerniert, können sie als zirkulierende lösliche Biomarker dienen, wie CEA (carcinoembryonic antigen) oder PSA (prostate specific antigen). Zum anderen erzeugen Tumorantigene eine zelluläre und/oder humorale Immunantwort. Tumorspezifische oder -assoziierte Antikörper besitzen ebenfalls ein großes Potenzial als zirkulierende Biomarker. Darüber hinaus sind die gezielte Unterstützung der spezifischen T-Zellantwort oder der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene vielversprechende Ansätze in der Immunotherapie, wie am Beispiel des monoklonalen Antikörpers Herceptin nachvollziehbar (Adams and Weiner, 2005).

1.2.1. Tumorantigene bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches

Für maligne Läsionen der oberen Atemwege sind wenige Biomarker bekannt oder identifiziert worden. Für den klinischen Einsatz werden einige wenige Marker wie p53, p16, EGFR oder virale Proteine diskutiert. Der Erfolg für Diagnose, Prognose und Therapie ist *bis dato* jedoch leider gering (Quon *et al.*, 2001). Bekannte tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene für diese Tumorentität sind p53 (Boyle *et al.*, 1993), EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) (Armstrong and Eck, 2003), CEA (carcinoembryonic antigen) und SCC (squamous cell carcinoma antigen) (Walther *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer geringen Spezifität bzw. Sensitivität sind diese jedoch nicht als diagnostische Marker geeignet.

1.3. Techniken zur Identifizierung von Tumorantigenen

Die Identifizierung geeigneter TAs als diagnostische, prognostische und therapeutische Marker ist seit vielen Jahren Gegenstand der onkologischen Forschung. Für diese Identifizierung

gen wurden verschiedenste Strategien entwickelt, die in Tabelle 1.1 kurz zusammengefasst sind (Kawakami *et al.*, 2004).

Tabelle 1.1: Strategien zur Identifizierung von Tumorantigenen.

Kriterien der Isolierung	Methoden und Techniken
Genomische DNA	Sequenzierung (Mutationen, Polymorphismen) Hybridisierungstechnik (Gen-Amplifizierung)
mRNA (Transkriptomanalyse)	cDNA-Subtraktion Differential Display DNA-Microarray, SAGE, EST-Datenbanken
Protein (Proteomanalyse)	Expressionsprofil-Vergleiche (2D-PAGE, Protein Chips) Isolierung und Identifizierung HLA-gebundener Peptide (HPLC, MS)
Immunogenität	cDNA-Expressionsklonierung mit Tumor-reaktiven T-Zellen cDNA-Expressionsklonierung mit Patienten-Serum (SEREX) Phagen-Peptid-Bibliotheken mit Patienten-Serum 2D-PAGE in Verbindung mit Patienten-Serum (PROTEOMEX, SERPA, SPEAR)

SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), EST (Expressed Sequence Tag), HPLC (High-Performance Liquid chromatography), SEREX (serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning), PROTEOMEX (Kombination aus Proteom und SEREX), SERPA (serological proteome analysis), SPEAR (serological and proteomic evaluation of antibody responses)

Neben der Analyse genomischer DNA auf Mutationen und krankheitsrelevante Polymorphismen spielen Transkriptom- und Proteomanalysen in den letzten Jahren eine immer größere Rolle bei der Identifizierung von TAs. Auf der Basis einer zellulären Immunantwort gegen TAs wurde bereits 1988 von Boon und Kollegen (De Plaen *et al.*, 1988) eine Methode zur Identifizierung von Tumorantigenen entwickelt. Aus Tumoren isolierte RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend in Expressionssysteme kloniert. Die Reaktivität gegen die rekombinant exprimierten Proteine wird mit tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert. Diese Technik wurde von (Falk *et al.*, 1991) und (Mandelboim *et al.*, 1994) modifiziert. Antigene Peptide wurden von den MHC-I-Molekülen auf Tumorzellen eluiert, die anschließend auf Zellen geladen wurden, die *per se* keine Antigen-Prozessierung durchführen können. Bei einer positiven Reaktivität mit Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) wurden die Peptide mittels Massenspektrometrie sequenziert. Beide Methoden führten zur Identifikation einiger TAs, hauptsächlich beim malignen Melanom, sind aber technisch äußerst aufwendig.

Von einigen Tumorantigenen war bekannt, dass sie neben der zellulären auch eine humorale Antwort hervorrufen können (p53: (Schlichtholz *et al.*, 1992) Her-2/neu: (Disis *et al.*, 1994)). Die erste Technik namens SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) auf der Basis einer humoralen Antwort gegen TAs wurde von Pfreundschuh und Kollegen 1995 etabliert (Sahin *et al.*, 1995). Zunächst werden cDNA-Banken aus Tumormproben generiert und in λ -Phagen Vektoren kloniert. Mit diesen Phagen werden anschließend *E. coli* infiziert. Rekombinante Proteine, die während der lytischen Infektion der Bakterien exprimiert werden, können auf Filter übertragen und mit Seren von Tumorpatienten oder gesunden Spendern inkubiert werden. Die Reaktion rekombinanter Proteine mit den Serumanantikörpern kann mit einem Zweitantikörper (anti-human-IgG) detektiert und die reaktiven Antigene durch Sequenzierung der cDNA-Fragmente identifiziert werden. Alternativ wurde SEREX mit cDNA Banken durchgeführt, die aus Testisproben hergestellt wurden, um vermehrt Cancer-Testis spezifische Tumorantigene zu identifizieren. SEREX ist die bisher am häufigsten eingesetzte Strategie zur Identifizierung humoraler TAs. Die Technik wurde bei einer Vielzahl von Tumorentitäten angewendet und führte zur Identifikation einer großen Anzahl neuer Antigene (siehe unter: www2.licr.org/CancerImmunomeDB/). Eine Weiterentwicklung von SEREX stellen Arbeiten von Mintz und Kollegen dar. Anstelle von cDNA-Banken werden hier Zufalls-Peptid-Bibliotheken in einem Phage-Display-System verwendet, um damit das Antikörper-Repertoire von Tumorpatienten zu analysieren (Mintz *et al.*, 2003).

Neben der cDNA-basierten SEREX-Methode wurden Proteom-basierte Techniken etabliert, die auf der Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot Analyse basieren (Klade *et al.*, 2001). Diese Strategien tragen die Akronyme PROTEOMEX (Kombination aus Proteomics und SEREX), SERPA (serological proteome analysis) und SPEAR (serological and proteomic evaluation of antibody responses). Der Einfachheit halber wird im Rahmen dieser Arbeit der Begriff PROTEOMEX verwendet. Proteine aus Tumormproben bzw. gesunden Geweben werden mittels 2D-Elektrophorese bezüglich Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt. Für jede Probe werden zwei möglichst identische 2D-Gele hergestellt, wovon eines mit Silber gefärbt wird und die aufgetrennten Proteine des zweiten Geles auf eine Membranen übertragen werden. Die Membran wird mit Serum eines Tumorpatienten bzw. eines gesunden Spenders inkubiert. Der Nachweis gebundener Serumanantikörper erfolgt, wie bei der SEREX-Methode, mit anti-human-IgG-spezifischen Zweitantikörpern. Unterschiede der erhaltenen Proteinmuster (Tumor vs. gesund) stellen potenzielle Tumorantigene dar. Die Antigene können nicht direkt aus dem Western Blot identifiziert

werden, sondern werden mit den Spotmustern des parallel hergestellten Silbergels abgeglichen, dort ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert.

PROTEOMEX und adäquate Techniken wurden *bis dato* in einer Vielzahl von Tumorentitäten durchgeführt, darunter Nierenzellkarzinom (Kellner *et al.*, 2002; Klade *et al.*, 2001; Unwin *et al.*, 2003), Neuroblastomen (Prasanna *et al.*, 2000), Lungenkarzinom und Brustkrebs (Le Naour, 2001).

Beide Identifizierungsstrategien, SEREX und PROTEOMEX, weisen eindeutige und Schwächen auf (Seliger and Kellner, 2002): Die SEREX-Methode besitzt aufgrund der Verwendung von cDNA-Banken eine hohe Sensitivität, da potenzielle TAs rekombinant exprimiert werden. Die cDNAs können zudem einfach mittels Sequenzierung identifiziert werden. SEREX erlaubt jedoch nicht die Identifizierung von TAs, die durch Tumor-spezifische posttranslationale Modifikationen hervorgerufen werden. Die Durchführung von SEREX ist zudem sehr aufwendig und somit für die gleichzeitige autologe Analyse mehrerer Patienten nicht geeignet (Seliger and Kellner, 2002). PROTEOMEX überkommt einige der bekannten Probleme von SEREX. Da die gesamte Strategie Protein-basiert und nicht cDNA-basiert funktioniert, ermöglichte PROTEOMEX erstmals die Detektion von Antigenen, die aufgrund von posttranslationalen Modifikationen immunogen wirken (Brichory *et al.*, 2001). Diese Modifikationen sind häufig tumorspezifisch und stellen somit interessante Zielstrukturen für die Immuntherapie dar. Die Methode läßt sich relativ schnell durchführen und ermöglicht somit die parallele Analyse mehrerer Patienten. Die Technik der 2D-Elektrophorese, also der Auftrennung der Proteine, ist jedoch technisch in ihrer Sensitivität begrenzt. So lassen sich maximal ca. 3000 der abundantesten Proteine mittels klassischer 2D-Elektrophorese auftrennen. In einer humanen Zelle existieren jedoch schätzungsweise 300.000 bis 500.000 Proteinspezies, wenn posttranskriptionale und posttranslationale Modifizierungen mit einbezogen werden. Ein weiterer technisch schwieriger Aspekt der Technik ist der Vergleich zwischen Immunoblot und dem zugehörigen Silbergel, da die Gefahr besteht, falsche Proteine durch einen ungenauen Vergleich der Spotmuster zu isolieren.

1.4. Zielsetzung

Maligne Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches gehören weltweit zu den häufigsten Krebsentitäten und sind aufgrund der späten Diagnose mit einer schlechten Prognose assoziiert. Für eine erwünschte Frühdiagnostik dieser Tumorentität stehen *bis dato* nur wenige geeignete Biomarker zur Verfügung. Biomarker, wie tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene, werden als potente Strukturen zur Früherkennung und Therapie von Malignomen diskutiert. Die Kenntnis über diese Tumorantigene ist somit eine Grundvoraussetzung für Diagnostik und Therapie.

Ziel dieser Arbeit war einerseits die technische Weiterentwicklung einer bestehenden Strategie zur Identifizierung von Tumorantigenen (AMIDA). AMIDA sollte dahingehend modifiziert werden, eine schnelle, reproduzierbare und allgemein einsetzbare Identifizierung von Tumorantigenen zu ermöglichen.

Andererseits sollte die optimierte Strategie eingesetzt werden, um neue Tumorantigene bei malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches zu identifizieren. Interessante Antigene sollten zunächst validiert und ihr diagnostisches bzw. therapeutisches Potential charakterisiert werden. Neue Tumorantigene sollten insbesondere funktionell hinsichtlich ihres Beitrags zur Karzinogenese und ihrer Bedeutung im Zellkontext analysiert werden.

2. Material

2.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle nicht aufgeführten und in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Amersham Biosciences, Merck bzw. Sigma bezogen.

2.1.1. Sonstige Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

Artikel	Bezugsquelle
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
7-Actinomycin D (7-AAD)	Sigma, Taufkirchen
Agar, Bacto-	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Roche, Mannheim
Aminoethylcarbazol	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Ammoniumbikarbonat	Sigma, Taufkirchen
Annexin-V-Biotin	Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin)	Sigma, Taufkirchen; Roche, Mannheim
Avidin-Biotin-PO Komplex (Vectorstain)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Bakterienmedienkomponenten (Trypton, Hefeextrakt)	Gibco BRL, Karlsruhe
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford (USA)
Blocklösung, <i>in situ</i> Hybridisierung	Roche, Mannheim
5-Bromo-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Roche, Mannheim
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Bruker, Leipzig
Denhardt's Lösung	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Merck, Darmstadt
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Seromed/Biochrom, Berlin
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Dimethylpimelimidat (Crosslinker)	Sigma, Taufkirchen
Dithioerythritol (DTE)	Sigma, Taufkirchen
DNA-modifizierende Enzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Roth New England Biolabs, Schwalbach
ECL Westernblotting System	Amersham, Freiburg

Ethanolamin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formamid (deionisiert)	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FKS)	Seromed/Biochrom, Berlin
Glyzin	Sigma, Taufkirchen
High Pure Plasmid Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
High Pure RNA Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
IPG Buffer	Amersham, Freiburg
Kollagenase, Typ 8	Sigma, Taufkirchen
Lachsspermien DNA	Stratagene, Amsterdam (NL)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Roche, Mannheim
Nukleotide (NTPs, dNTPs)	Boehringer Mannheim/Roche
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten (phosphate-buffered saline)	Gibco BRL, Karlsruhe
Peptidfragmentstandard für MALDI-ToF	Sigma, Taufkirchen
Plasmidpräparation „Jetstar“	Genomed, Bad Oeynhausen
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Taufkirchen
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Proteinase K	Dako, Glostrup (DK)
Protein G Sepharose „4 Fast Flow“	Amersham, Freiburg
Proteingrößenstandard „Benchmark“	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
DNA QuiaShredder	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Schwalbach
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)
siRNA	Eurogentec, Liège (Belgien)
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Thiazolylblau-tetrazoliumbromid	Sigma, Taufkirchen
Transfektionsreagenz „MATRa-A“	IBA, Göttingen
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
TriPure	Roche, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, (TRIS)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma, Taufkirchen
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen
t-RNA	Sigma, Taufkirchen
Trypsin, Zellkultur	Seromed/Biochrom, Berlin

Trypsin, Porcine, Seq.Grade Modified	Promega, Madison (USA)
Tween	Serva, Heidelberg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Bezugsquelle
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein, München
Chamber Slides (Glas, Permanox)	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Chambered Coverglass, 1.5 Borosilicate	LAB-TEK Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford (USA)
IPG-Strips	Amersham, Freiburg
Kanülen	BD, Heidelberg
Mutiscreen-BV Filterplatten	Millipore, Bedford (USA)
Objektträger „Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Gilson, Bad Camberg
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falkon/BD Le Pont de Claix (F); Nunc, Wiesbaden
Slide-A-Lyzer Dialysis, 10,000 MW	Pierce, Rockford (USA)
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Spritzen, 5 ml/10 ml/20 ml	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falkon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugensäulen (Mobicols)	MoBiTec, Göttingen
ZipTip µ-C18	Millipore, Bedford (USA)

2.1.3. Geräte

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte.

Artikel	Bezugsquelle
2D-Elektrophoresekammer Ettan Dalt	Amersham, Freiburg
Agarose-Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Agarose-Elektrophoresekammern	Amersham, Freiburg

AnchorChip-Metallplatten 200-800µm	Bruker Daltonics, Bremen
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton-Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Richmond (USA)
ELISA-Reader ELx800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“ mit hochauflösender Digital- Videokamera (Hamamatsu)	Zeiss, Oberkochen
Fokussierungsanlage „IPGphor“	Amersham, Freiburg
Fokussierungseinheiten Porzellan	Amersham, Freiburg
Glaswaren Schott	Roth, Karlsruhe
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, München
Lyophilisator mit Speedvac	Bachofer, Reutlingen
Massenspektrometer (Reflex III)	Bruker, Rheinstetten
Mikroliter-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Standard 25	Zeiss, Oberkochen
Schüttelinkubatoren 2Certomat	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Sorvall, Bad Homburg

2.1.4. Dienstleistungen

Tabelle 2.4:

DNA-Sequenzierungen	Sequiserve, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
siRNA-Synthese	Eurogentec, Liège (Belgien)
Microarray-Hybridisierung	IMGM, Martinsried

2.2. Antikörper

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper.

Antikörper (Katalog-Nummer)	Bezugsquelle
α-hnRNP H (BL1043)	Bethyl Laboratories, Montgomery (USA)
α-Grb-2 (610112)	Becton-Dickinson, Heidelberg

α -Hsp27 (05952)	Dianova, Hamburg
α -BiP/Grp78 (SR-B826)	MoBiTec, Göttingen
α -Actin (sc-1616)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -HA 3F10 (1867423)	Roche, Mannheim
α -ARAF1 (sc-408-G)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -myc (9E10; sc-40)	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -FLAG M2 (F3165)	Sigma, Taufkirchen
HRP Ziege- α -Kaninchen (111-035-003)	Dianova, Hamburg
HRP Kaninchen- α -Ziege (P0449)	Dako, Glostrup (Dänemark)
HRP Kaninchen- α -Ratte (P0450)	Dako, Glostrup (Dänemark)
α -Kaninchen IgG, biotinyliert (BA-1000)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -Ratte IgG, biotinyliert (BA-9400)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -Maus IgG, biotinyliert (BA-2000)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
α -DIG-AP (1093274)	Roche, Mannheim

2.3. Bakterien

Der verwendete Stamm wurde von Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

E. coli DH5 α (Hanahan, 1985):

F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, 1-, thi-1, gryA96, relA1

2.4. Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die durch mehrere Klonierungsschritte unter Verwendung üblicher Klonierungstechniken generiert wurden (Maniatis *et al.*, 1989). Einige der verwendeten Plasmide waren in der Arbeitsgruppe vorhanden oder wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Die mit * gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit von mir kloniert.

Tabelle 2.6: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung
IRALp962M101	RZPD Klon, cDNA hnRNP H, Ampicillin-Resistenz
141pCAG-3SIP	CMV, SV40, IRES, Puromycinresistenz; von Dr. T. Schröder zur Verfügung gestellt
141pCAG::hnRNPH-sense *	hnRNP H cDNA sense in 141pCAG-3SIP

141pCAG::hnRNPH-AS *	hnRNP H cDNA antisense in 141pCAG-3SIP
pcDNA3.1Hyg	CMV, Hygromycinresistenz, Invitrogen (Karlsruhe)
pcDNA3.1Hyg-N-HA	CMV, N-terminaler HA-Tag, Hygromycinresistenz, von Dr. T. Schaffrik zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1Hyg-N-HA::hnRNPH *	hnRNP H N-terminal fusioniert mit HA-Tag in pcDNA3.1Hyg-N-HA
pcDNA3.1Hyg-C-HA	CMV, C-terminaler HA-Tag, Hygromycinresistenz, von Dr. T. Schaffrik zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1Hyg-C-HA::hnRNPH *	hnRNP H C-terminal fusioniert mit HA-Tag in pcDNA3.1Hyg-C-HA
pME18S-FLAG-MST2	MST2 fusioniert mit FLAG-Tag in pME18S, CMV, von Dr. Eric O'Neill, Glasgow zur Verfügung gestellt
pEF-myc-ARAF1	ARAF1 fusioniert mit myc-Tag in pEF, CMV, Blasticidin-Resistenz, von Dr. Eric O'Neill, Glasgow zur Verfügung gestellt
pDRIVE	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/ Kanamycinresistenz, Qiagen (Hilden)
pDRIVE::hnRNPH *	hnRNP H cDNA sense in pDrive (<i>in situ</i> Hybridisierung)
pCR 4-TOPO TA	Klonierungsvektor, T7/Sp6, Ampicillin-/ Kanamycinresistenz, Invitrogen (Karlsruhe)

2.5. Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet bzw. generiert (*).

Tabelle 2.7:

Zelllinie	Herkunft	Referenz
HEK-293	Embryonale Niere	(Graham <i>et al.</i> , 1977)
HEK-293::N-HA-hnRNPH *	Embryonale Niere	Transfiziert mit Vektor pcDNA3.1Hyg-N-HA::hnRNPH
HEK-293::C-HA-hnRNPH *	Embryonale Niere	Transfiziert mit Vektor pcDNA3.1Hyg-C-HA::hnRNPH
ANT-1	Hypopharynx-Karzinom	(Mayer <i>et al.</i> , 2005), 1998 in unserem Labor etabliert
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC HTB-43
GHD-1	Hypopharynx-Karzinom	Dr. Anna Mayer, 1998 in unserem Labor etabliert
GHD-1::N-HA-hnRNPH *	Hypopharynx-Karzinom	Transfiziert mit Vektor pcDNA3.1Hyg-N-HA::hnRNPH
GHD-1::C-HA-hnRNPH *	Hypopharynx-Karzinom	Transfiziert mit Vektor pcDNA3.1Hyg-C-HA::hnRNPH

HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC CCL-2
MRC5	Humane embryonale Lungen-fibroblasten	ATCC CCL-171
PCI-1	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI-13	Hypopharynx-Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
SKBR3	Mamma-Karzinom	ATCC HTB-30
Wi38	Humane embryonale Lungen-fibroblasten	ATCC CCL-75
A549	Lungen-Karzinom	ATCC CCL-185

2.6. Oligonukleotide

2.6.1. Primer

Tabelle 2.8: Verwendete Primer.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	AAAATGGGGCTCAAGGTATTCG	hnRNP H RT-PCR
1b	GCTATTTCTGTGAAGCAAAGTGC	
2a	TGTCGCTCTTGAAGTCAGAGGAGA	GAPDH RT-PCR
2b	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG	
3a	ACACTGTGCCCATCTACGAGG	Aktin RT-PCR
3b	AGGGGCCGGACTCGTCATACT	
4a	TAGCCTAGAGAGGCCGCTAACAGA	NCSTN RT-PCR
4b	GCTTGCTCTCCAGCAGAACCATGT	
5a	GCTGGACGATAGCTTGGA	AKT1 RT-PCR
5b	GATGACAGATAGCTGGTG	
6a	GCTTGCTCTGGCCATGGAAT	APR2 RT-PCR
6b	AGGCCTGTGCTTGGGCTTGAA	
7a	TTCCCACCAGCAACCAGCGC	P8 RT-PCR
7b	CTTCCTCTCTGAATTCTGCAGCT	
8a	ATGGCAGCAGTAAAGCAAGCG	Bcl-X RT-PCR
8b	TCATTTCCGACTGAAGAGTGA	
9a	ATGGAGCCACCACGGGGC	ARAF1 RT-PCR
9b	CGTCTTTCGTCCCTTGATGAGTC	
10a	ATGTCTTCGCCTCCCGAAG	DAP RT-PCR
10b	CAGTGGGTTTAGGTGGACTG	
11a	AAAGCTAGCATGATGTTGGGCACGGAAG	hnRNP H Überexpression
11b	AAAGCTAGCCTATGCAATGTTTGATTGAAAATCAC	
12a	ATGGTACCATGATGTTGGGCACGGAAG	hnRNP H N-HA Fusion

12b	AAAGCGGCCGCTATGCAATGTTTGATTGAAAATCAC	
13a	ATGGGTACCTCATGATGTTGGGCACGGAAGG	hnRNP H C-HA Fusion
13b	AATCTAGATGCAATGTTTGATTGAAAATCAC	
14a	ATGGGTACCTCATGATGTTGGGCACGGAAGG	hnRNP H ISH
14b	AAAGCGGCCGCTATGCAATGTTTGATTGAAAATCAC	

2.6.2. siRNAs

Tabelle 2.9: Verwendete siRNAs.

Nr.	Sequenz 5'-3'	Verwendung
1a	GGAGCUGGCUUUGAGAGGA dTdT	hnRNP H siRNA#1
1b	UCCUCUCAAAGCCAGCUCC dTdT	
2a	GAAUAGGGCACAGGUAUUAU dTdT	hnRNP H siRNA#2
2b	AUAUACCUGUGCCCUAUUC dTdT	
3a	GCAAGGAAGAAUUGUUCA dTdT	hnRNP H siRNA#3
3b	UGAACAAUUUCUCCUUGC dTdT	
4a	UCGUCCGUAUCAUUCAAU dTdT	Ktrl. siRNA
4b	AUUGAAAUGAUACGGACGA dTdT	

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Aufbewahrung und Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxid und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Standardmedium für Suspensionszellen und adhärente Zellen war Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Bei stabilen Transfektanten wurde das Kulturmedium mit 200 µg/ml Hygromycin B bzw. 1 µg/ml Puromycin supplementiert. Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst, einmal in Medium mit 10% FKS gewaschen und in gewünschter Dichte ausplattiert. Die Zentrifugation von eukaryontischen Zellen zum Zweck der Konzentrierung oder des Waschens erfolgte bei 350g für 5-10 min bei 20°C.

Für die Kryokonservierung wurden Zellen (10^6 - 10^7 pro Aliquot) in 0,75 ml Einfriermedium aufgenommen (10% v/v DMSO, 40% v/v FKS, 50% v/v DMEM) und in ein 1,8 ml-Kryogefäß (Nunc) überführt. Zur langsamen Abkühlung wurden die Zellen zunächst in einem verschlossenen Styroporbehälter in ein -80°C-Gefriergerät gestellt. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung eingefrorener Zellen wurde der Röhrcheninhalt durch Resuspension mit warmen Kulturmedium (Zimmertemperatur) möglichst schnell aufgetaut und in mindestens 20 ml Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium resuspendiert und kultiviert.

3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde jeweils ein Zellaliquot (20 µl) mit einem Volumen einer 0,2%igen Trypanblaulösung (in 1xPBS) gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind im Mikroskop an ihrer blauen Farbe erkennbar.

3.1.3. Berechnung der Verdoppelungszahl

Die Verdoppelungszahl (t_d) von Zellen wurde mit folgenden Formeln berechnet:

$$t_d = \ln 2 / \lambda$$

$$\lambda = (\ln(n_0) - \ln(n_x)) / (t_0 - t_x)$$

n_0 = Zellzahl an Tag 0; n_x = Zellzahl an Tag x; λ = Wachstumskonstante; t_0 = Tag 0; t_x = Tag x

3.1.4. Generierung von Zelllysaten

Für die Gewinnung von Gesamtzelllysaten wurden FaDu- bzw. PCI-1-Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst und einmal in PBS gewaschen. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 350g für 5-10 min bei 20°C. Die so erhaltenen Zellpellets wurden in Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 45min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die unlösliche Fraktion wurde mittels Zentrifugation (10min bei 4500g, 4°C) entfernt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mittels dem BCA-Test (BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers.

Für die Gewinnung von Zelllysaten für die 2D-Elektrophorese wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Biochrom) von der Kulturflasche gelöst und einmal in PBS gewaschen. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 350g für 5-10 min bei 20°C. Die Zellen wurden in PBS/H₂O (1:1) und anschliessend in 50mM Tris pH 7,5 gewaschen. Die Zellen wurden in 470µl 2D-Lysepuffer lysiert, die austretende DNA durch Zentrifugation in Qiashredder Säulen zerkleinert (14000g, 2min, RT) und anschließend bei 42000g (1h, RT) pelletiert. Die lysierten Proteine wurden anschließend mittels 2D-PAGE aufgetrennt.

- Lysispuffer: TBS pH7,4; 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (1 Tablette / 50ml)

- 2D-Lysepuffer: 9M Harnstoff, 4% CHAPS, 65mM DTT, 2,5mM EDTA

3.2. Immunpräzipitation und 2D-Elektrophorese (allo-AMIDA)

3.2.1. Immunpräzipitation

Blut (20ml) von Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom der oberen Atemwege litten, wurde routinemäßig entnommen. Das Vollblut wurde zentrifugiert (1700g, 15min, Raumtemperatur, keine Bremse), das so gewonnene Serum abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Aufreinigung der IgG-Antikörper aus dem Serum erfolgte mit Protein G-Affinitätssäulen (Montage spin columns, Millipore, Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers. Isolierte

Antikörper wurde auf eine Endkonzentration von 10mg/ml in PBS eingestellt. Die Güte der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung kontrolliert.

Die aufgereinigten Serumantikörper von Tumorpatienten wurden auf Protein-G-Matrix immobilisiert (20mg Antikörper, 500µl Matrix, 1h, RT) und nach (Schneider *et al.*, 1982) kovalent gekoppelt. Parallel wurden IgG-Antikörper gesunder Spender (Gemisch aus 100 Spendern; Sigma, Taufkirchen; Lot 011K9019) gleichermaßen immobilisiert. Die Antikörper-Protein-G-Matrix wurde bei 4°C mit den Lysatproben (siehe 3.1.4) über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Für die Immunpräzipitation wurden Komplettlysate der Zelllinien FaDu bzw. PCI-1 verwendet (aus 1×10^8 Zellen). Anschließend wurde die Sepharose-Matrix zweimal mit Lysispuffer und einmal mit 50mM Tris (pH7,4) gewaschen (500 g, 10 min, 4°C), um unspezifische Bindungen zu lösen. Die präzipitierten Antigene wurden in 470µl 2D-Lysepuffer eluiert und denaturiert. Um die Protein-G-Sepharose-Matrix komplett zu entfernen, wurden die Proben für 10min bei 7000g und 4°C zentrifugiert. Nach der Elution wurde die Probe mit DTE (1% w/v) versetzt. Die eluierten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch in einer ersten Dimension bezüglich ihres isoelektrischen Punktes (pI) und in einer zweiten Dimension bezüglich ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

- Lysispuffer: TBS pH7,4; 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (1 Tablette / 50ml)

- 2D-Lysepuffer: 9M Harnstoff, 4% CHAPS, 65mM DTT, 2,5mM EDTA

3.2.2. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung von Proteinen wurde in pH-Gradientengelstreifen (IPG: immobilisierter pH Gradient) unterschiedlicher pH-Bereiche (pH 3-10 und pH 4-7) durchgeführt (Länge 24cm). Jede Probe wurde mit IPG-Puffer und Bromphenolblau (BPB) versetzt (450µl 2D Lysepuffer, 2µl IPG-Puffer, 2µl BPB) und in einer IPGphor-Fokussierungseinheit aufgetrennt. Die Laufbedingungen der Fokussierung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst: Die Fokussierung erfolgte über einen Zeitraum von ca. 30h bei 20 °C und 50µA/Streifen. Die üblicherweise erhaltene Gesamtvoltstundenzahl betrug 80-85kVh. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder bei -80°C eingefroren bzw. die zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt.

- Resolving-Puffer: 1,5mM Tris (pH 8,8), 0,4% SDS, 1,5mM NaN₃

- Bromphenolblaupuffer: 3mM Bromphenolblau in Resolving Puffer

Tabelle 3.1: Laufbedingungen der IEF für IPG-Streifen (24 cm).

Stufen	Spannung (V)	24 cm, Dauer (h)
1	30	8
2	50	4
3	200	2
4	500	2
5	2000	2
6	4000	2
7	8000 (Gradient)	1
8	8000	*

* Fokussierung bei 8000V bis eine Gesamtvoltstundenzahl von ca. 80kVh erreicht ist

3.2.3. Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

IPG-Streifen wurden sukzessive mit bromphenolblau-haltigem Equilibrierungspuffer behandelt, der jeweils 65mM DTE bzw. 215mM 2-Iodacetamid enthielt. Anschließend wurden die IPG-Streifen auf 10-13% SDS-Polyacrylamid Gele aufgelegt, mit 0,5% Agarose (in Equilibrierungspuffer) fixiert und die fokussierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-Lauf Puffer; 3W/Gel, 30min zum Einlaufen der Proteine, danach 18 W/Gel).

- Equilibrierungspuffer: 6M Harnstoff; 3,3M Glycerin; 70mM SDS; 3.3% Resolving Puffer

- SDS-Laufpuffer: 1,92M Glycin; 0.25M Tris; 1% SDS

Die Detektion der Proteine erfolgte mit einer Massenspektrometrie-kompatiblen Silber Färbung. Das verwendete Protokoll ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 3.2: Silber-Färbung.

Schritt	Lösung	Dauer (min)
1	Fixierer	60
2	Ethanol 50%	20
3	Ethanol 50%	20
4	Ethanol 50%	20
5	Sensitivierung	2
6	Wasser	1
7	Wasser	1
8	Silber	30
9	Wasser	1
10	Wasser	1

11	Entwickler	0,5 – 3
12	Stopp	10
13	Wasser	5
14	Aufbewahrung	45

- Fixierlösung: 50% Ethanol; 12% Essigsäure

- Ethanollösung: 50% Ethanol

- Sensitivierungslösung: 1,5mM Natriumthiosulfat

- Silberlösung: 12mM Silbernitrat; 0,075% Formaldehyd (37%)

- Entwicklerlösung: 0,57M Natriumcarbonat; 2,5% Sensitivierungslösung; 0,05% Formaldehyd (37%)

- Stopplösung: 40mM EDTA

- Aufbewahrungslösung: 20% Ethanol; 4% Glycerin

3.3. Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Analyse (MALDI-ToF)

Ausgewählte Proteinspots wurden aus Silber-gefärbten 2D-Gelen ausgeschnitten, tryptisch verdaut und anschließend mit einer organischen Matrix auf einer Anker-Metallplatte für die MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time-of-Flight)-Analyse kristallisiert und vermessen. Die erhaltenen „peptide mass fingerprints“ wurden zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptide mass fingerprint“-Proteindatenbanken verglichen.

3.3.1. Tryptischer Verdau

Der tryptische Verdau der Gelstücke erfolgte mit dem Montage In-Gel Digest 96 Kit (Millipore, USA) nach einem veränderten Protokoll. Das Absaugen von Flüssigkeiten erfolgt hier mit Hilfe einer Vakuumanlage, so dass maximal 96 Proben parallel verarbeitet werden konnten. Dazu wurden die Gelstücke, welche die gewünschten Proteinspots enthielten, kleingeschnitten und in 96-Loch-MultiScreen-Platten (Millipore, USA) überführt. Die Gelstücke wurden mit 100µl Wasser (Millipore) zweimal 10-30min bei RT gewaschen. Um das Silber auszuwaschen, wurden die Spots mit 100µl Entfärber versetzt und so lange im Schüttler inkubiert, bis keine Färbung mehr sichtbar war (5-10min). Anschließend wurde dreimal mit Millipore-Wasser nachgewaschen. Die Gelstücke wurden dann zweimal abwechselnd für je 10-15min mit 50% Acetonitril bzw. 50mM Ammoniumbicarbonat (frisch angesetzt) gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in 30µl 50mM Ammoniumbicarbonat und Trypsin (Endkonzentration 100ng/µl) aufgenommen und über Nacht bei 30°C verdaut. Um ein Verdunsten der Lösungen zu verhindern, wurden die 96-Loch-MultiScreen-Platten mit einer Klebefolie abgedichtet. Nach dem tryptischen Verdau wurde der Überstand mittels Vakuum in eine 96-Loch-Platte überführt und die verbliebenen Gelstücke zweimal mit 100µl Extraktionslösung

für je 30min bei RT inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, mit dem erstem vereinigt und in 1,5ml Eppendorf Gefäße überführt. Die vereinigten Überstände wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert (SpeedVac, 45min, RT). Anschließend wurde das Lyophilisat bei -20°C gelagert.

- Entfärber: 30mM Kaliumhexacyanoferrat und 100mM Natriumthiosulfat im Verhältnis 1:1 vermischt (frisch angesetzt) in Millipore-Wasser

- Extraktionslösung: 75% Acetonitril, 50mM Ammoniumbicarbonat in Millipore-Wasser

3.3.2. Konzentrierung des tryptischen Verdaus / Kristallisierung auf Anker-Metallplatten

Die Anker-Metallplatte wurde vor jeder Messung mit 50% Methanol gesäubert und luftgetrocknet. Die Lyophilisate des tryptischen Verdaus wurden in 10µl Waschlösung aufgenommen und unter Ultraschall gelöst. Die Konzentrierung und Entsalzung des tryptischen Verdaus erfolgte mit Hilfe von ZipTips (ZipTip µ-C18, Millipore, USA) nach eigenem Protokoll. Nach Vorbehandlung der ZipTips mit Equilibrierungslösung (3 x 10µl) und Waschlösung (1 x 10µl) erfolgte die Bindung der tryptischen Peptide an die Säule. Die Entsalzung erfolgte mit Waschlösung (3 x 10µl). Die Peptide wurden anschließend mit 2µl Elutionslösung aus der Säule gespült und à 1µl auf die Anker-Metallplatte (AnchorChip Durchmesser: 600µm) pipetiert. Nach Kristallisation erfolgte die Messung in einem MALDI-ToF Massenspektrometer (Reflex III).

- Waschlösung: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Millipore-Wasser

- Equilibrierungslösung: 50% Acetonitril in Millipore-Wasser

- Elutionslösung: Gesättigte α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA) in 50% Acetonitril 0,1% Trifluoressigsäure in Millipore-Wasser

3.3.3. MALDI-ToF Analyse

Zur Analyse der aufgetragenen Peptidfragmente wurde die Anker-Metallplatte in das Massenspektrometer (MALDI-ToF) eingeführt. Anschließend wurden die in der CHCA-Matrix ko-kristallisierten Peptidfragmente im Hochvakuum mit Hilfe eines Lasers ionisiert und deren massen- und ladungsabhängige Flugzeit durch ein angelegtes Spannungsfeld bestimmt. Die so erhaltenen Massenspektren wurden anschließend kalibriert und zur Identifizierung des jeweiligen Proteins mit „peptide mass fingerprint“ Proteindatenbanken verglichen (<http://www.matrix-science.com>).

3.4. *In-situ* Hybridisierung

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden Kryoschnitte (5µm) für 10min in 4% PFA fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 x 5min in 30%, 50%, 70%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Schnitte aufgetaut, die endogene alkalische Phosphatase mit HCl (0,2N) für 10min inaktiviert und das Gewebe mit Proteinase K (10µg/ml) für 10min behandelt, um die RNA für die Sonden zugänglich zu machen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte in 0,1M Glyzin/0,05M PBS gegeben und anschließend bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Präparate stets mit PBS gewaschen. Um positiv geladene Moleküle zu neutralisieren, wurde das Gewebe in 0,1M Triethanolamin / 0,25% Essigsäureanhydrid inkubiert und anschließend mit 2xSSC gewaschen. Zur Prähybridisierung wurden die Präparate mit Prähybridisierungspuffer in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 5h inkubiert. Für die Sonden wurde die hnRNP H-cDNA in den PCR-Klonierungsvektor pDrive kloniert und sequenziert. Dieser Vektor besitzt sowohl eine T7 als auch eine SP6 Polymerasebindestelle, die eine Transkription des PCR Fragments in 5'- und in 3'-Orientierung erlauben. Auf diese Weise konnten Sense- und Antisense-RNA-Sonden generiert werden. Der sequenzierte pDrive::hnRNP H Klon wurde mit BamHI oder XhoI-Restriktion linearisiert und DIG-markierte RNA Sonden mittels *in-vitro*-Transkription im Kit-System (DIG RNA Labeling Kit, Roche) nach Angaben des Herstellers produziert. Die Hybridisierung der Sonden erfolgte in Prähybridisierungspuffer (0,2-1ng Sonde/µl Puffer) für 16h bei 65°C. Unspezifische Bindungen der Sonden am Präparat wurden anschließend mit 2xSSC (bei 48°C) und 0,2xSSC (2 x 30min, 70°C) depletiert. Die Detektion der DIG-markierten RNA-Sonden erfolgte mit einem Alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-DIG-Antikörper. Die Entwicklung der Präparate erfolgte bei 30°C für 14-16h in Färbelösung.

- Prähybridisierungspuffer: 50% deionisiertes Formamid, 4x SSC, 5x Denhardts, 25µg/ml Lachsspermien DNA, 0,1% SDS, 50 µg/ml t-RNA, 5% Dextran Sulfat

- 20xSSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0

- Färbelösung: 10mM Tris pH 9,5; 100mM NaCl, 10% w/v Polyvinylalkohol, 50mM MgCl₂, 0,35% Nitroblau Tetrazolium (NBT), 0,35% 5-Bromo-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)

3.5. Immunhistochemische Schnittfärbungen

Gewebeproben von Karzinompatienten und gesunden Probanden wurden routinemäßig während der Operation entnommen, sofort in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbungen wurden an Gefrier-

schnitten durchgeführt. Dazu wurden 4µm dicke Kryoschnitte auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen, getrocknet und 10min in Azeton bei RT fixiert. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Schnitte in Azeton nachfixiert und für 10min in PBS rehydriert. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurde eine 0,3% Wasserstoffperoxidlösung in PBS verwendet. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte anschließend 20min mit 10%igem Ziegen Serum behandelt. Die Primärantikörper wurden in 1:10 bis 1:500 Verdünnungen eingesetzt und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde PBS an Stelle des Erstantikörpers verwendet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Biotin-konjugierten Sekundärantikörper für 30min bei RT inkubiert, in PBS gewaschen und die Antigen-Antikörperreaktion unter Verwendung des Avidin-Biotin-Peroxidase Systems nach (Hsu *et al.*, 1981) detektiert. Die Präparate wurden bei Bedarf zur Visualisierung der Zellen mit einer Eosin-Kernfärbung gegengefärbt. Die Färbeintensität der einzelnen Proben wurde von zwei Experimentatoren unabhängig voneinander bestimmt.

3.6. Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen wurden an adhärenenten, stabil transfizierten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu auf Chamber-Slides (LAB-TEK) ausplattiert und für 24 bis 48h weiterkultiviert. Die Proben wurden nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, mit Azeton fixiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Alle weiteren Behandlungs- und Färbeschritte waren mit denen an Gewebeschnitten, wie unter Kapitel 3.5 beschrieben, identisch.

3.7. Zytospin

Trypsinierte Zellen (4×10^5 Zellen) wurden auf Objektgläser zentrifugiert (250g, 5min, RT) und anschließend mit Azeton fixiert. Alle weiteren Behandlungs- und Färbeschritte waren mit denen an Gewebeschnitten, wie unter Kapitel 3.5 beschrieben, identisch.

3.8. Molekularbiologische Methoden

Die Anwendung gängiger, allgemeiner Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt werden, wie Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren und deren Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA-

Enden mit alkalischer Phosphatase, Auffüllen 5'-überhängender DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über Affinitätsmatrices, Ligation freier DNA-Enden, etc. erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Maniatis *et al.*, 1989).

3.8.1. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach ihrer Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration (0,8 - 2,5%) aufgetrennt. Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA ist dabei dem Logarithmus der Fragmentgröße umgekehrt proportional. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht wurde die Agarose mit Ethidiumbromid (0,75µg/ml) versetzt. Die Laufbedingungen wurden durch die Spannung begrenzt, die sich aus dem Abstand der beiden Elektroden (3V/cm) errechnete.

- Laufpuffer: (45mM Tris-Borat, 1mM EDTA (1xTBE)

- 6x Ladepuffer: 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol EF, 30% Glycerin in Wasser

- Marker: Gene Ruler 1kb DNA Marker (250bp - 10kb), ϕ X174 DNA/ BsuRI (HaeIII) Marker (72-1353 bp), 50bp DNA Marker (50-1031 bp), Fermentas

3.8.2. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Alle RT-PCR-Reaktionen wurden nach dem Zwei-Stufen-Protokoll durchgeführt, d.h. die Reverse Transkription und die nachfolgende PCR fanden im separaten Reaktionsgefäßen statt. Die RNA wurde stets mit DNase behandelt und mittels PCR auf das Vorhandensein von genomischer DNA überprüft.

Die Reverse Transkriptase schreibt einsträngige RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) um. Dies erfolgte mit Hilfe des Reverse Transkription Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers. Für jede Reaktion wurde 1µg RNA eingesetzt.

Die semi-quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20µl mit 2µl des 10x-PCR-Puffers, je 1pmol des sense- und des antisense-Primers, 2,5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 1U Taq Polymerase und 1µl cDNA. Die Amplifizierung erfolgte in 20-25 Zyklen mit jeweils einer 30sec Denaturierungsphase bei 95°C, 30sec Annealingphase bei 53-60°C und einer Elongationsphase bei 72°C für 30sec. Die quantitative Analyse des Amplifikationsansatzes erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Die semi-quantitative Auswertung der Bandenintensitäten (abzüglich der Hintergrundintensität des Gels) erfolgte mit der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.9. Bakterienkultur

3.9.1. Vermehrung und Aufbewahrung

Bakterien wurden als Suspensionskultur in Luria Broth Medium (LB) oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienflüssigkultur mit 15% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

- LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl, pH 7.2

- Bacto-Agar-Platten: 12,5% Bacto-Agar ad 1l LB-Medium

- Endkonzentrationen der Antibiotika:

<i>Ampicillin</i>	100 µg/µl
<i>Chloramphenicol</i>	34 µg/µl
<i>Kanamycin</i>	30 µg/µl

3.9.2. Transformation von *E. coli*

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme erfolgte durch aufeinanderfolgende Inkubation einer *E. coli* DH5α-Kultur in den Puffern TfBI und TfBII auf Eis (Hanahan, 1983). Zu einem Aliquot (100 µl) der so behandelten Bakterien wurden ca. 50 ng eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA pipettiert und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschockschritt bei 42°C für 1,5min. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium und einer 45-minütigen Anzucht bei 37°C unter Schütteln wurde die Zellsuspension auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

- TfBI-Puffer: 100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM KAc, 10mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 5,8

- TfBII-Puffer: 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 7,0

3.10. Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA oder siRNA wurde mit MATra-A Reagenz (IBA) durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht in 6-Loch-Platten bis zu einer Dichte von 70-80% unter Standardbedingungen kultiviert. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Stabile Transfektanten wurden durch anschließende Selektion mit Hygromycin bzw. Puromycin bis zu einer maximalen Konzentration von 200 µg/ml bzw. 1 µg/ml gewonnen. Eine Stunde nach der Transfektion mit siRNA wurden die Zellen trypsiniert und zur weiteren Kultivierung in Petrischalen oder Zellkulturflaschen ausplattiert.

3.11. Western Blot

Proteinlysate wurden in 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen in einer vertikalen Elektrophorese aufgetrennt (Laufbedingungen: 180 V; 30 mA/Gel) und anschließend auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Western Blot: 100V; max. 500mA; 40-45 min). Durch 30-minütige Inkubation der Membran in Blockpuffer wurden unspezifische Bindungen von Antikörpern unterbunden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern bzw. Antisera (1:1000 bis 1:20000 in Primärantikörper-Puffer) und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:5000 in Block-Puffer). Die Detektion der Peroxidase-Reaktion erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting System (Amersham Biosciences).

- 10 x Laufpuffer: 250mM Tris, 2M Glycin, 1% SDS

- 10 x Blotting-Puffer: 250mM Tris, 1,26M Glycin

- Waschpuffer: PBS + 0,2 % Tween

- Blockpuffer: 5% w/v Magermilchpulver in Waschpuffer

- Primärantikörper-Puffer: 3% w/v BSA in Waschpuffer

3.12. FACS-Analysen

3.12.1. Quantifizierung der Transfektionseffizienz

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz eukaryotischer Zellen mit siRNA erfolgte mit Hilfe des Durchflußzytometers (fluorescence-activated cell sorter, FACS). Dafür wurden Zellen mit 5'-Fluorescein-konjugierter siRNA transient transfiziert. Die Menge der siRNA in den Einzelzellen wurde 24h nach Transfektion im FACS bestimmt.

3.12.2. Propidiumiodid-(PI)-FACS-Analyse

Für die PI-FACS-Analysen wurden die trypsinierten Zellen abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und 1h in 20% PBS, 80% Ethanol auf Eis fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen anschliessend in PI-Färbelösung inkubiert (10-15min, auf Eis, im Dunklen). Die Menge an Propidiumiodid pro Einzelzelle wurde im Durchflußzytomter gemessen.

- PI-Färbelösung: 10U RNase (DNase-frei), 50µg/ml Propidiumiodid, 2mM EDTA, in PBS

3.12.3. Annexin-V-Analyse

Die Annexin-V-Analyse zur quantitativen Bestimmung von Phosphatidylserin auf der Oberfläche apoptotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des Annexin-V-Biotin-System (Roche) nach

Angaben des Herstellers. Zur Detektion toter Zellen wurde anstelle von Propidiumiodid 7-Actinomycin D (7-AAD) benutzt.

3.13. MTT Assay (Mosmann, 1983)

Die Konversion des Substrates MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) durch eine mitochondriale Dehydrogenase dient als Maß die metabolische Aktivität und die Vitalität von Zellen (Mosmann, 1983). Durch die enzymatische Umsetzung entsteht ein Formazan-Produkt, das durch die Messung der optischen Dichte bei 540nm quantifiziert wird. Je 3×10^3 Zellen wurden in 96-Loch Platten kultiviert. Zur Messung der MTT-Konversion wurde zu den Zellen je 10µl/Loch MTT-Reagenz zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurden die gebildeten Farbkristalle in 200µl/Loch eines 24:1 Gemisches aus Isopropanol und 1 M HCl gründlich lysiert und anschließend die optische Dichte (OD) bei 540nm in einem ELISA-Gerät gemessen. Parallel erfolgte eine Messung bei der Referenzwellenlänge von 630nm.

- MTT-Reagenz: 100mg (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid) in 20ml PBS

3.14. Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Die Herstellung der Sonden mittels *in-vitro*-Transkription (IVT) aus jeweils 10µg Gesamt-RNA, die Hybridisierungsreaktionen auf Human Genome Survey Microarrays (Applied Biosystems, V2.0), das Auslesen der Arrays (Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer) und die Primäranalyse wurden von der Firma IMGM, Martinsried durchgeführt. Alle weitere Analysen und die quantitative Auswertung der Daten wurden von mir nach Absprache mit Herrn Dr. Sartori, Applied Biosystems durchgeführt. Dazu wurden die erhaltenen Rohdaten der Genexpression von 32.878 Proben zunächst nach dem Regulationsfaktor (siRNA#1 / Ktrl. siRNA) sortiert. Der Schwellenwert für eine signifikante Regulation eines Gens wurde auf den Faktor +/- 3 festgelegt. Dadurch ergab sich eine Reduktion auf 2.399 signifikant hochregulierte und 864 herunterregulierte Gene. Der zweite Schritt der Auswertung betraf das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (S/N) der analysierten Genexpressionen. Technisch bedingt werden nur solche Gene als signifikant exprimiert angesehen, deren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis $S/N > 3$ ist. Nach diesem Sortiervorgang ergaben sich 358 induzierte und 292 reprimierte Gene (Summe: 650), mit denen alle weiteren Analysen durchgeführt wurden.

Die weitere Klassifizierung der Gene erfolgte mit der Software PANTHER (<https://panther.appliedbiosystems.com>) mit Implementierung des Celera Discovery Systems nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems). Die Analyse erfolgte zunächst mit dem Unterprogramm „Gene Expression Tools / Analyze a list of genes with expression values“. Hier erfolgte dann die Klassifizierung nach Gruppen „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ bzw. „Signalweg“. Die Sortierung nach Genen, die an der Apoptose beteiligt sind, erfolgte über die Gruppe „Biologischer Prozess“, Untergruppe „Apoptose“.

3.15. Ko-Immunpräzipitation

Antikörper wurden auf Protein-G-Sepharose immobilisiert (1 µg Antikörper, 30 µl Sepharose, 30 min, RT) und nach (Schneider *et al.*, 1982) kovalent gekoppelt. Die Antikörper-Protein-G-Matrix wurde bei 4°C mit Lysaten aus Zelllinien (siehe Kapitel 3.1.4) über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose-Matrix fünfmal mit Lysispuffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu lösen. Die präzipitierten Proteine und Proteinkomplexe wurden in Proteinauftragepuffer eluiert und denaturiert (Laemmli, 1970). Die Detektion der Immunpräzipitate bzw. Ko-Immunpräzipitate erfolgte anschließend mittels Western-Blot (siehe Kapitel 3.11).

- Lysispuffer: TBS pH 7,4; 1% v/v Triton 100; Protease Inhibitor Cocktail Complete (1 Tablette /50ml)

- Proteinauftragepuffer: 140mM Tris-HCl pH 7,0; 30% Glycerin; 4% SDS; 16% Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau

3.16. Kinase-Aktivitäts-Assay

In-Gel-Kinase-Aktivitäts-Assays wurden in Zusammenarbeit mit Eric O'Neill, Glasgow durchgeführt (O'Neill *et al.*, 2004). Immunpräzipitate wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei in die Gele Myelin Basic Protein (MBP) (0,5mg/ml) ko-polymerisiert wurde. Die In-Gel-Kinase-Aktivitäts-Assays wurden nach (Kameshita and Fujisawa, 1989) durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift des Protokolls wurden die Gele für 30min in 20mM HEPES pH 7,4; 10mM MgCl₂, 15mM Beta-Glycerophosphat, 0,3mM Na₃VO₄ inkubiert. Anschließend wurden 50 µM ATP zugegeben (Gesamtvolumen 10ml), welches 1,85MBq [³²P] γ-ATP enthielt.

4. Ergebnisse

Wie schon in der Einleitung dargestellt, entwickeln Tumorpatienten eine spezifische humorale Antwort gegen Tumorantigene. Die spezifische Interaktion von Autoantikörpern und Autoantigenen kann benutzt werden, um neue Tumorantigene zu identifizieren. Im Labor wurde die AMIDA-Technologie entwickelt, um Tumor-assoziierte Antigene aufgrund dieser spezifischen Interaktion zu isolieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, die bestehende AMIDA-Technik zu optimieren und weiterentwickeln (Kapitel 4.1.1). Dazu wurde eine allogene Variante der Technik etabliert (allo-AMIDA). Allo-AMIDA ermöglicht die Identifizierung von Antigenen mittels aufgereinigter Antikörper aus Seren von Tumorpatienten in Kombination mit Tumorzelllinien. Mit dieser neuen Technik wurden potenzielle neue Tumorantigene bei malignen Erkrankungen des Hals-Rachen-Bereiches identifiziert (Kapitel 4.1.2). Ein weiteres Ziel war die Validierung der neu identifizierten Antigene *in vivo* (Kapitel 4.1.3). Im zweiten Teil (Kapitel 4.1.4ff) wurde ein identifiziertes Antigen, hnRNP H, detaillierter funktionell analysiert, da *bis dato* laut Literatur kein Zusammenhang dieses Proteins mit Tumoren bekannt ist.

4.1. Identifizierung und Validierung neuer humoraler Tumorantigene in Plattenepithelkarzinomen der oberen Atemwege

4.1.1. Weiterentwicklung der AMIDA-Technologie zur Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen (allo-AMIDA)

AMIDA (*autoantibody-mediated identification of antigens*) ist eine Proteom-basierte Technik, die es erlaubt, Tumorantigene zu identifizieren. Die AMIDA-Technologie basiert auf der spezifischen Autoantikörper-vermittelten Selektion und Aufreinigung potenzieller Tumorantigene und deren anschließender zweidimensionaler Auftrennung und Isolierung. AMIDA ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt und wird im Folgenden kurz beschrieben, bevor auf die Optimierung und Weiterentwicklung der Methode eingegangen wird.

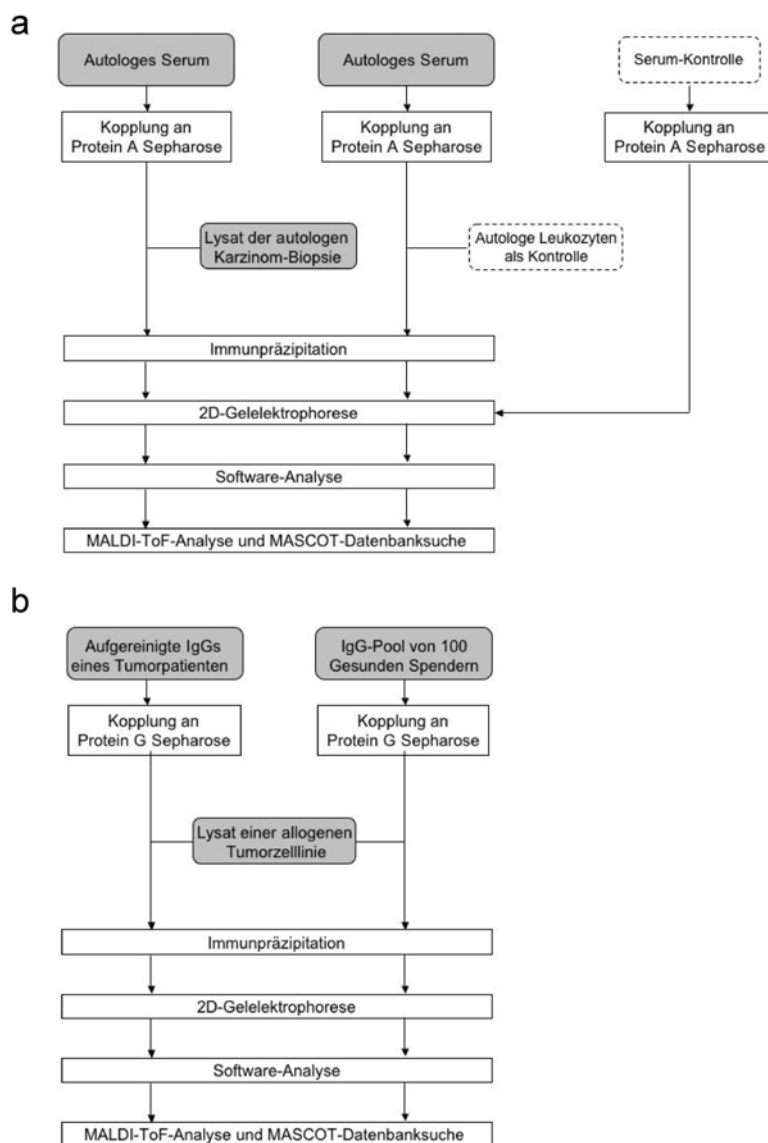


Abbildung 4.1: Flussdiagramme der autologen (a) und allogenen AMIDA-Technologie (allo-AMIDA) (b).

Bei der chirurgischen Entfernung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich wurden routinemäßig Blut und eine Tumorbiopsie entnommen. Die Karzinombiopsien wurden je nach Größe entweder zu Membran-Fractionen weiterverarbeitet oder – bei kleineren Biopsien mit weniger als 10^7 Zellen – zu Gesamtllysaten verarbeitet, die dann als Proteinquelle für die anschließende Immunpräzipitation (IP) genutzt wurden. Parallel wurden aus dem autologen Serum des Patienten Immunglobulin G Antikörper (IgGs) kovalent auf Protein A Sepharose gebunden. Diese so immobilisierten Antikörper wurden zur IP mit dem autologen Proteinlysate benutzt. Immunpräzipitierte potenzielle Tumorantigene wurden anschließend in einer ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung) und weiter in einer zweiten Dimension (vertikale

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) separiert. Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde Coomassie Brilliant Blue oder Silbernitrat verwendet. Nach tryptischem In-Gel Verdau interessanter Antigene erfolgte die Identifizierung mittels MALDI-ToF Analyse in Kombination mit einer MASCOT-Datenbanksuche.

Im Folgenden wird auf die Weiterentwicklung und Optimierung der bestehenden Technik detailliert eingegangen, die gemeinsam mit Herrn Martin Ahlemann durchgeführt wurde. Änderungen und Eigenschaften sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Immunpräzipitation (IP)

Blut (20ml) von Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom der oberen Atemwege litten, wurde routinemäßig entnommen. Aus dem Serum wurden anschließend über Affinitätssäulen (Protein G Sepharose) IgG Antikörper aufgereinigt und mit PBS auf eine Konzentration von 10mg/ml eingestellt. Die Güte dieser Aufreinigung wurde mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Diese aufgereinigten Antikörper (20mg) wurden auf Protein G Sepharose (500µl) immobilisiert und mit Hilfe des „Crosslinkers“ Dimethylpimelimidat kovalent fixiert. Parallel wurden aufgereinigte humane IgGs, die aus einem „Pool“ (n=100) gesunder Spender stammen, auf die gleiche Weise immobilisiert. Die so immobilisierten Antikörper wurden jeweils zur Präzipitation von Lysaten von Plattenepithelkarzinomzelllinien benutzt, um potenzielle Tumorantigene zu isolieren.

Zweidimensionale Gelelektrophorese

Immunpräzipitierte Proteine wurden anschließend zweidimensional aufgetrennt, wobei die erste Dimension aus einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) über einen immobilisierten pH-Gradienten (pH 4-7, 80kVh) bestand. Nach dieser Auftrennung der Proteine bezüglich ihres jeweiligen isoelektrischen Punktes (pI) erfolgte die zweite Dimension mittels einer vertikalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Auftrennung der Präzipitate erfolgte hier anhand des Molekulargewichtes der Proteine. Visualisiert wurden die aufgetrennten Präzipitate mittels Silberfärbung. Repräsentative 2D-Gele eines aufgetrennten Gesamtzelllysates (a) und einer IP (b) sind in Abbildung 4.2 gezeigt. Nach Auswertung der Gele mittels Image Master 2D Software ergab das Gesamtzelllysate aus 5×10^5 Zellen ca. 110 Proteinspots. Die IP von 5×10^7 Zellen – also 100-mal mehr Zellen - ergab ca. 600 Proteinspots. Die Komplexität des

separierten Proteingemisches nach IP ist demnach deutlich reduziert. Für den allo-AMIDA-Screen wurden Gesamtzelllysate aus 1×10^8 Zellen verwendet.

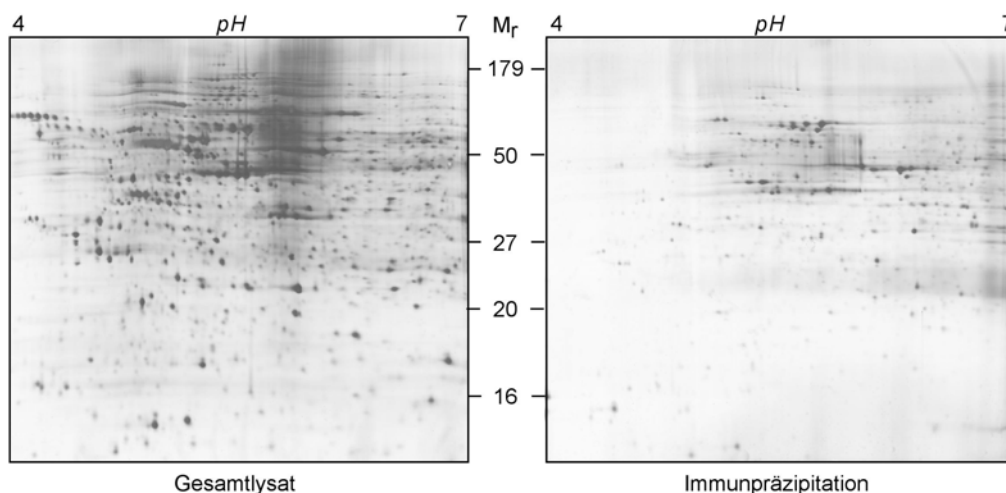


Abbildung 4.2: Reduktion der Proteinkomplexität durch allo-AMIDA. Ein Gesamtlysat der Zelllinie FaDu (5×10^5 Zellen) wurde zweidimensional aufgetrennt (IEF: pH4-7, 80kVh; SDS-PAGE: 11% Acrylamid) (Gesamtlysat). Proteine aus einem Gesamtlysat der Zelllinie FaDu (5×10^7 Zellen) wurden mit immobilisierten Serumantikörpern (10mg) präzipitiert und zweidimensional aufgetrennt (Immunpräzipitation). Beide Gele wurden anschließend mit Silbernitrat gefärbt.

Die Proteinmuster der 2D-Gele der Kontroll-IP und IPs mit Antikörpern von Tumorpatienten wurden mittels Image Master 2D Software verglichen, um so tumorspezifische- bzw. tumor-assoziierte Antigene (TAA) zu differenzieren. In einigen Ausnahmen erfolgte die Auswertung der Gele auf differenzielle Proteine auch „per Auge“ ohne Software. Repräsentative zweidimensionale Gele von aufgetrennten Präzipitaten mit IgGs von gesunden Spendern sowie Tumorpatienten sind exemplarisch in Abbildung 4.3 gezeigt. Durchschnittlich wurden auf diesen 2D-Gelen zwischen 800 und 1100 Spots detektiert. Im Vergleich von Präzipitaten von Tumorpatienten zu gesunden Spendern waren ca. 99,5% aller Spots identisch. Nur ca. 5-6 Spots pro Gel, also 0,5%, wurden selektiv auf IPs von Tumorpatienten detektiert. Diese Proteine, welche selektiv mit IgGs von Tumorpatienten isoliert wurden, wurden als potenzielle TAAs betrachtet und weiter analysiert (Abbildung 4.4). Einzige Ausnahme bildeten differenzielle Spots im Bereich der leichten und schweren Immunglobulinketten. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass es sich um IgGs handelte. Diese Proteine wurden folglich nicht als potenzielle Tumorantigene eingeordnet.

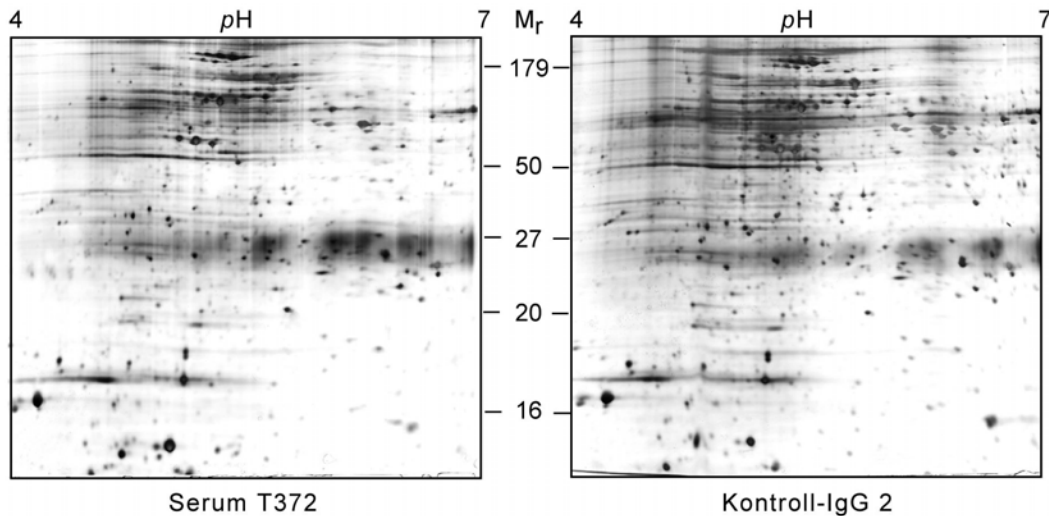


Abbildung 4.3: Repräsentative zweidimensionale Gele eines allo-AMIDA Screenings. Gezeigt sind die Immunpräzipitate der Plattenepithelkarzinomlinie FaDu mit IgGs gesunder Spender (Kontroll-IgG 2) und eines Patienten mit Plattenepithelkarzinom (Serum T372).

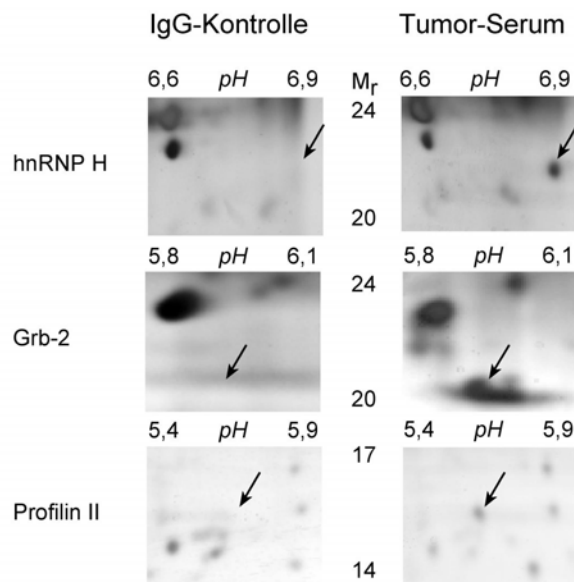


Abbildung 4.4: Ausschnitte aus 2D-Gele von FaDu-Proteinen, die mit Kontroll-IgGs (links) bzw. Antikörpern aus Tumorseren (rechts) immunpräzipitiert wurden. Die Gesamtpräzipitate wurden zweidimensional aufgetrennt (1. Dimension: IEF pH4-7. 2. Dimension: 11% SDS-PAGE). Die Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt und mittels Image Master 2D Software ausgewertet. Differentielle Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die jeweiligen pH- und Molekulargewichtsbereiche sind angegeben.

MALDI-ToF Analyse

Proteine, die nach der Software-Analyse exklusiv auf Gelen mit Immunpräzipitaten von Tumorseren vorkamen, wurden mit einem Skalpel aus dem Gel entfernt und tryptisch verdaut. Die tryptischen Peptide des Proteins wurden mit α -Cyano-4-hydroxymizsäure auf einer Me-

tallplatte kristallisiert und anschließend in einem MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionisation Time of Flight) Massenspektrometer (Bruker Reflex 3) analysiert.

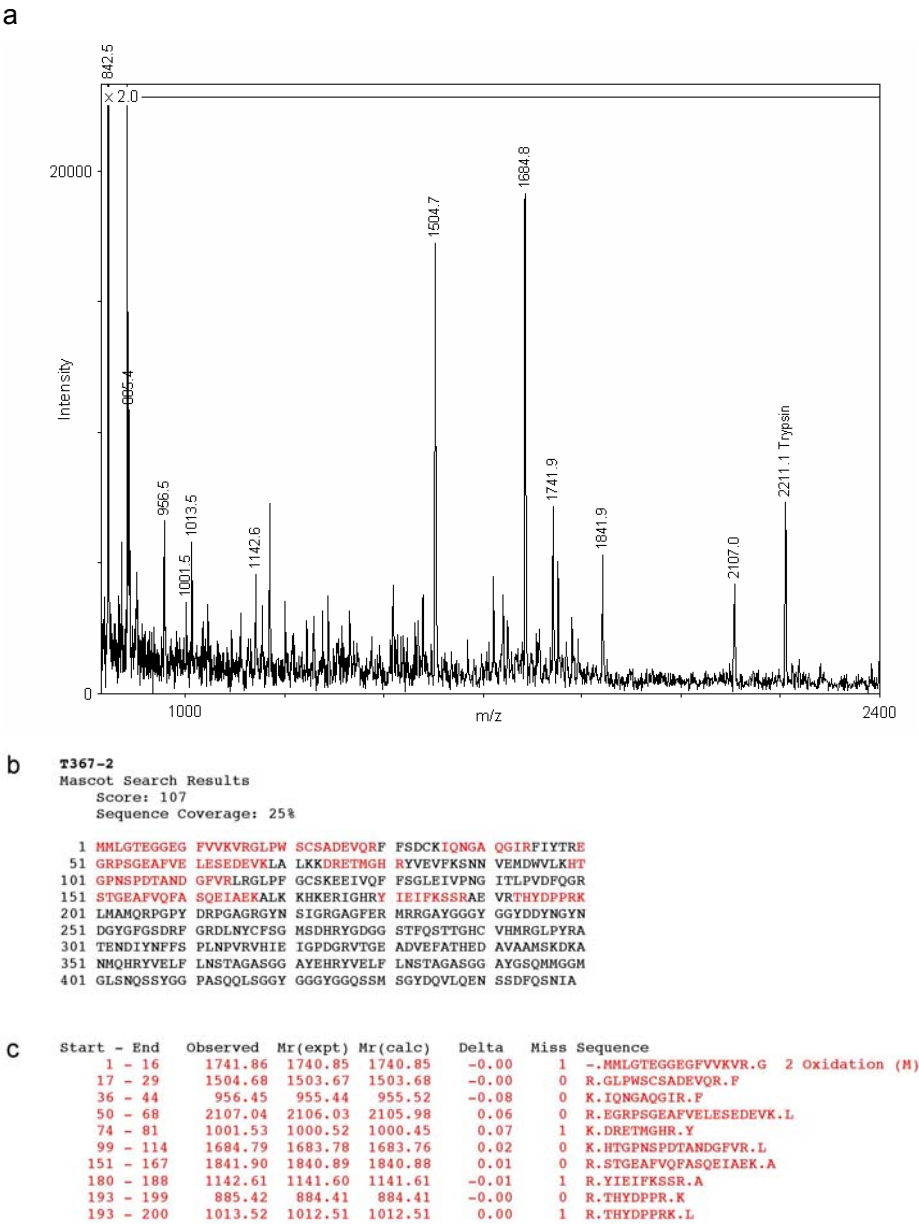


Abbildung 4.5: „Peptide mass fingerprint“ und MASCOT-Datenbankanalyse eines Proteins. Das analysierte Protein wurde aus einem Silber-gefärbten 2D-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und in einer CHCA-Matrix (α -cyano-4-Hydroxymethylsäure) mittels MALDI-ToF Massenspektrometer analysiert. Gezeigt sind das Massenspektrum des Proteins T367-2 (a), die Sequenzüberlagerung analysierter Peptide (rot) mit dem Gesamtprotein (schwarz) (b) sowie eine Auflistung aller identifizierten Peptide des Proteins (c). Dargestellt sind die gemessenen Peptidmassen (M_r (expt)) und die theoretisch berechneten tryptischen Peptide der Datenbank (M_r (calc)). „Delta“ beschreibt den Unterschied zwischen gemessenem und berechnetem Molekulargewicht (in Da) und ist demnach ein Maß für die Güte der Messung.

Mit dem erhaltenen Massenspektrum, einem sog. „Peptide mass fingerprint“ (PMF) des analysierten Proteins, wurde eine Datenbanksuche (<http://www.matrixscience.com>) durchgeführt.

Aus einem Vergleich des gemessenen mit dem theoretisch berechneten PMF lässt sich das Protein identifizieren. Im Durchschnitt konnten ca. 60% aller silber-gefärbten Proteine identifiziert werden. Abbildung 4.5 zeigt einen solchen Fingerprint im Massenspektrum sowie das Ergebnis der Datenbanksuche. Diese Auswertung soll repräsentativ für alle in dieser Arbeit mittels MALDI-ToF Analyse identifizierten Proteine stehen.

4.1.2. Isolierung und Identifizierung potenzieller neuer Tumorantigene

Die neu etablierte allogene Variante der AMIDA-Technik wurde im Folgenden verwendet, um potenzielle Tumorantigene zu identifizieren. Dazu wurden Seren von acht Tumorpatienten verwendet, die an malignen Erkrankungen des Hals-Rachen-Bereiches leiden (Tabelle 4.1). Hierbei handelte es sich überwiegend um Karzinome des Oro- bzw. Hypopharynx in späten Stadien (T2 bis T4).

Tabelle 4.1: Seren von Tumorpatienten, die im Rahmen des allo-AMIDA-Screenings zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden.

Serum	Diagnose*	Bemerkungen, Histologie*	Zelllinie**
T240	cT2-3 cN3 M0	Zungengrundkarzinom, gering differenziertes pleomorphes, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom	FaDu, PCI-1
T247	pT4 pN2bp Mx G3	Larynxkarzinom, gering differenziertes Plattenepithelkarzinom	FaDu
T346	pT3 pN0 M0, G2, R0	Oropharynxkarzinom, mäßiggradig differenziertes, stellenweise gering verhornendes Plattenepithelkarzinom	FaDu
T360	k.A.	Oropharynxkarzinom	FaDu
T366	cT4 cN2c MX	Oro-Hypopharynxkarzinom, mittelhoch differenziertes, verhornendes Plattenepithelkarzinom	FaDu, PCI-1
T367	cT2 cN3 M1 G2	Oro-Hypopharynxkarzinom, mäßig differenziertes, teils verhornendes Plattenepithelkarzinom	FaDu, PCI-1
T372	pT2 pN0 M0	Geringgradig differenziertes, nicht verhornendes Plattenepithelkarzinom	FaDu, PCI-1
T373	cT4 cN1 M0 G3	Oro-Hypopharynxkarzinom, gering differenziertes Plattenepithelkarzinom	FaDu, PCI-1

* alle Angaben lt. Arztbrief.

** Lysat der Zelllinie, mit dem die IP durchgeführt wurde.

Aus diesen Seren wurden IgG Antikörper aufgereinigt. Die Durchführung der IP mittels allo-AMIDA erfolgte anschließend mit den Plattenepithelkarzinomzelllinien FaDu und PCI-1.

Tabelle 4.2: Proteinname, Datenbank-Nummer (SwissProt) und MASCOT Search Scores (ID Score) der isolierten allo-AMIDA-Antigene.

Nr	Protein	Swiss- Prot ID	ID Score	Sequenz- abd. (%)	theor. MW (kDa)	exp. MW (kDa)	theor. PI (pH)	exp. PI (pH)	Häufigkeit	
									FaDu n/t	PCI-1 n/t
1	e-FABP	<u>Q01469</u>	125	70	15,3	16	6,54	6,5	2/8	3/5
2	Cytidine desaminase	<u>P32320</u>	86	61	16,6	17	6,55	6,3	0/8	1/5
3	Grb 2	<u>P29354</u>	122	51	21,5	22	7,19	6,0	2/8	0/5
4	TRIP-1	<u>Q13347</u>	168	50	36,9	36	5,38	5,6	2/8	0/5
5	PSP1, α	<u>Q8WXF1</u>	186	26	58,8	50	6,26	6,3	3/8	0/5
6	hnRNP H	<u>P31943</u>	107	25	49,5	23	5,89	6,8	2/8	0/5
7	Tropomyosin 3 Isoform 2	<u>Q8TCG3</u>	67	28	28,8	27	4,72	4,8	1/8	0/5
8	Profilin II	<u>P35080</u>	108	41	15,0	16	6,75	5,6	1/8	0/5
9	Cortactin	<u>Q14247</u>	96	17	61,8	66	5,24	5,6	1/8	0/5
10	Tubulin beta 1	<u>P07437</u>	132	33	49,3	38	4,75	5,5	1/8	1/5
11	BiP protein	<u>Q9UK02</u>	79	18	72,1	70	5,03	5,0	1/8	0/5
12	Hsp27	<u>P04792</u>	165	42	22,4	24	7,80	6,9	1/8	1/5

Ein Score ≥ 62 steht für einen p-Wert $< 0,05$ (Student's T-test). A-Ag: Autoantigen; TAA: Tumorassoziertes Antigen; Sequenzabd. %: Sequenzabdeckung aller identifizierten Peptide auf der theoretischen Peptidkarte des Proteins; theor. MW: theoretisches Molekulargewicht des Proteins; exp. MW: experimentell ermitteltes Molekulargewicht des Proteins; theor. PI: theoretischer isoelektrischer Punkt des Proteins; exp. PI: experimentell ermittelter isoelektrischer Punkt des Proteins; n: Anzahl reaktiver Patientenseren bezüglich des identifizierten Tumoran-
tigens; t: Gesamtzahl der Patientenseren innerhalb des AMIDA-Laufes.

Auf diese Weise konnten insgesamt 37 Proteine identifiziert werden, die ausschließlich von Antikörpern aus Patienten präzipitiert wurden und nicht von IgGs aus gesunden Spendern. Alle differentiellen Proteine wurden aus den Gelen ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. 27 Proteine wurden mit signifikanten Mowse Scores ($p \leq 0,05$)

mittels MASCOT-Datenbanksuche identifiziert. Vier dieser Proteine wurden als schwere oder leichte humane Immunglobulinketten identifiziert und wurden folglich nicht als potenzielle TAs eingeordnet.

Ein Teil der Proteine (Grb 2, hnRNP H, TRIP-1, PSP-1 und e-FABP) wurde mit Seren von 2 bzw. 3 Patienten identifiziert. Insgesamt konnten 12 unterschiedliche potenzielle TAs identifiziert werden, wie Tabelle 4.2 zu entnehmen ist. Aufgeführt sind der Name des Proteins (Spalte 2), die jeweilige Identifizierungsnummer der SwissProt-Datenbank, ausserdem der Score der MASCOT-Datenbanksuche und die Sequenzabdeckung. Bei allen Proteinen wurden die experimentell ermittelten Molekulargewichte sowie deren isoelektrischer Punkt mit den theoretisch berechneten verglichen. Mit Ausnahme des Proteins hnRNP H stimmten theoretische und experimentelle Werte überein, so dass insgesamt von der richtigen Identifizierung der Proteine ausgegangen werden kann. Auf die signifikante Abweichung bei hnRNP H und eine mögliche Ursache wird in einem späteren Kapitel (4.3) eingegangen. Die 12 potenziellen Antigene lassen sich in folgende funktionelle Gruppen einteilen:

- (i) Kernproteine (Paraspeckle Protein 1, heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein 1),
- (ii) Proteine, die an Signalwegen beteiligt sind (Grb2, TRIP-1),
- (iii) Proteine, die im Zellmetabolismus eine Rolle spielen (e-FABP, Cytidin Desaminase),
- (iv) Chaperone (Hsp27, BiP),
- (v) Zytoskelettproteine (TPMsk3, profilin II, cortactin und tubulin beta)

Neun der 12 allo-AMIDA-Antigene weisen laut Literatur bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine erhöhte Expression auf bzw. sind mit Tumoren assoziiert. Fünf Antigene sind bereits als Tumorantigene identifiziert worden. Bezüglich der Tumorentität Hals-Rachen-Raum ist nur von Grb-2 bekannt, dass das Protein bei Nasopharynxkarzinomen stark exprimiert ist. Zum Zeitpunkt der Identifizierung der potenziellen Antigene war laut Literatur für vier Antigene (PSP-1, hnRNP H, Profilin II, TRIP-1) keine Assoziation mit Tumoren beschrieben.

4.1.3. Validierung der Tumorantigene Grb2, Hsp27, BiP und hnRNP H

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurden im Rahmen des allo-AMIDA-Screens Proteine identifiziert, die einerseits als TAs bekannt sind bzw. allgemein in der Onkologie beschrieben worden sind. Andererseits wurden auch potenzielle neue TAs isoliert, die *bis dato* nicht als TA bekannt waren oder in Zusammenhang mit der Karzinogenese gebracht wurden.

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargestellt, gibt es diverse Ursachen für das Auftreten von TAs (Disis and Cheever, 1996). Neben Mutationen im Gen, die die Ursache für die Immunogenität des Proteins sind, spielen vor allem die Menge sowie der Ort der Expression des Proteins eine überragende Rolle. Im Folgenden sollte daher die Expression ausgewählter allo-AMIDA-Antigene in Bezug auf Quantität und Lokalisation studiert werden.

In einigen Karzinomentitäten, darunter Brustkrebs (Fung *et al.*, 2000; Kairouz and Daly, 2000; Verbeek *et al.*, 1997) und im Bereich der oberen Atemwege (Nasopharynxkarzinom) (Fung *et al.*, 2000) wurde bereits eine erhöhte Expression des Proteins Grb-2 beschrieben. Ob Grb-2 bei malignen Erkrankungen der oberen Atemwege auch in anderen Geweben exprimiert wird, war *bis dato* nicht bekannt. Daher wurde die Grb-2-Expression in Tumorgewebe von HNO-Patienten sowie in gesundem Rachenepithel untersucht. Dazu wurden Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 4µm von Tumorbiospien (n=4), darunter auch eine Tumormetastase, sowie gesunde Rachenepithelien (n=4) mit einem Grb-2-spezifischen Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Es zeigte sich, dass sowohl in Tumorzellen (Abbildung 4.6b) als auch in metastasierenden Zellen (Abbildung 4.6c) eine mittlere bis hohe Expression von Grb-2 nachweisbar war. Alle untersuchten gesunden Rachenepithelien hingegen zeigten keine oder nur eine sehr schwache Expression (Abbildung 4.6a). Diese schwache Expression ließ sich der Basalzellschicht (stratum basale) zuordnen, also einer Zellschicht mit einem hohen proliferativen Potenzial.

Ebenso wurden Tumorgewebe von HNO-Patienten sowie gesunde Rachenepithelien auf die Expression von Hsp27 (Abbildung 4.6d-f) analysiert. Tumorproben (n=8) und Metastasen (n=4) zeigten eine mittlere bis hohe Expression von Hsp27. Die analysierten gesunden Rachenepithelien (n=2) wiesen eine starke Expression auf, die auf Bereiche des suprabasalen Epithels beschränkt war. Die Expression nahm ausgehend von der Basalzellschicht hin zu supraepithelialen Bereichen zu. Zusätzlich konnte eine Expression des Proteins in Nervenzellen, Endothelzellen (Adrentitia) und wenigen Fibroblasten festgestellt werden.

Die Analyse der BiP-Expression in gesunden Epithelien (n=2), Tumoren (n=2) und Metastase (n=1) zeigte eine nahezu ubiquitäre Expression des Proteins (Abbildung 4.6g-i). Neben Epithel-, Tumor- und metastasierenden Tumorzellen konnte auch in Gefäßen, Fibroblasten und lymphozytären Infiltraten eine Expression von BiP detektiert werden.

Im Folgenden wurde ein weiteres AMIDA-Antigen, welchem bislang keine Funktion in der Karzinogenese zugeteilt wurde, studiert. Die Expression des Antigens hnRNP H wurde dazu in Gefrierschnitten untersucht. Da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper kommerziell verfü-

bar war, wurde die Expression von hnRNP H zunächst mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) untersucht.

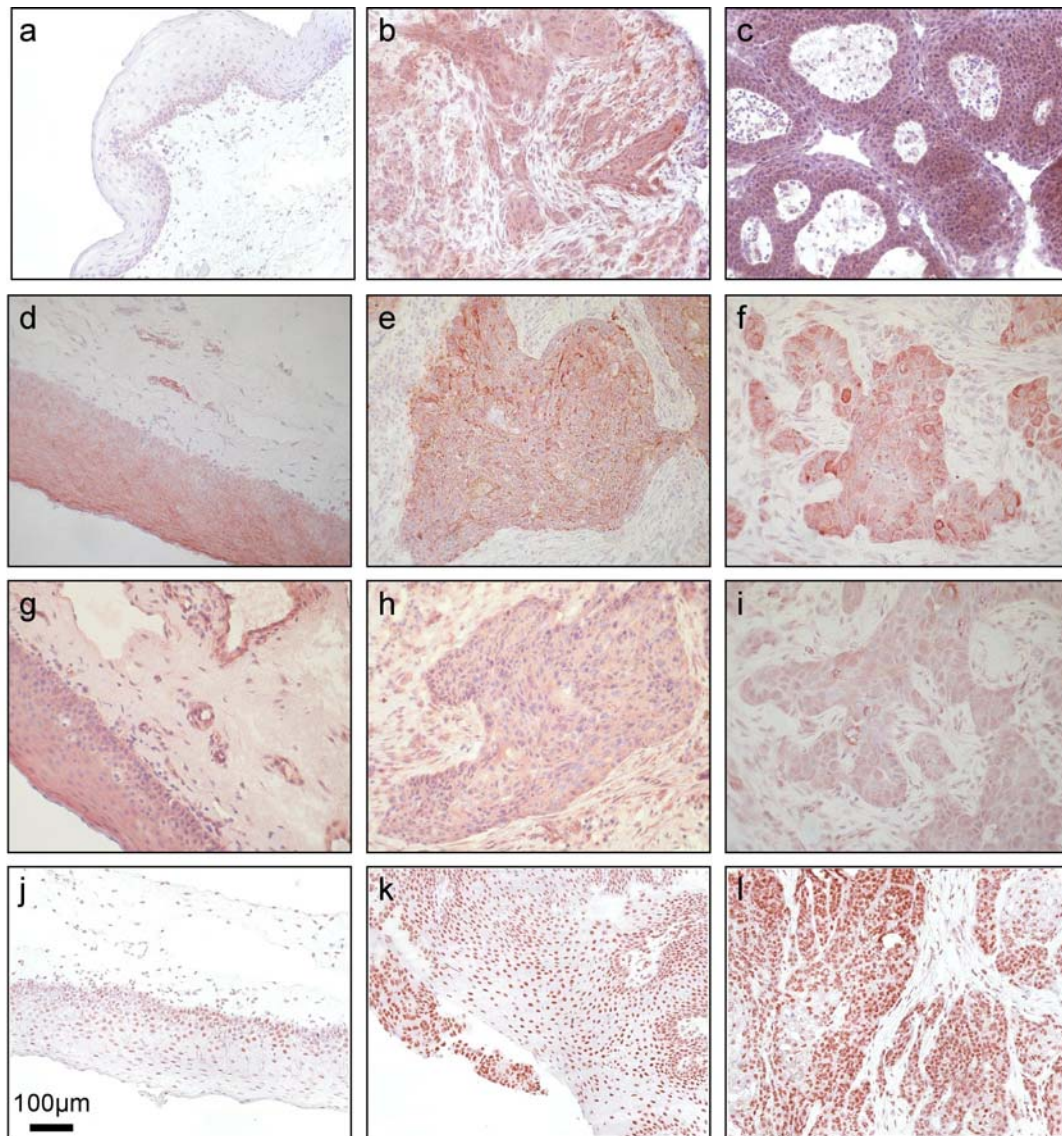


Abbildung 4.6: Grb-2-, Hsp27, BiP- und hnRNP H-Expression in morphologisch gesundem Rachenepithel, Karzinom und Metastase. Gefrierschnitte von Biopsien wurden mit spezifischen Antikörpern für Grb-2, Hsp27, BiP bzw. hnRNP H in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper gefärbt. Tumorfrees, gesundes Epithel (a, d, g, h), Karzinom (b, e, h, k) und Metastase (c, f, i, l) färbten sich unterschiedlich stark mit Grb-2-spezifischem (a-c), Hsp27-spezifischem (d-f), BiP-spezifischem (g-i) sowie hnRNP H-spezifischem (j-l) Antikörper.

Für die ISH wurden Gefrierschnitte zweier Tumorbiopsien von Patienten mit Hypopharynx- bzw. Oropharynxkarzinom und als Kontrolle Gewebeproben von gesunder Rachenschleimhaut (n=2) untersucht. Die hierbei verwendete RNA-Sonde umfasste die gesamte kodierende Region der hnRNP H-mRNA. Es zeigte sich, dass die untersuchten Karzinome im Vergleich

zu Epithelzellen der gesunden Rachenschleimhaut stark erhöhte Mengen an hnRNP H-mRNA aufwiesen (Abbildung 4.7). Eine geringe Expression von hnRNP H in der gesunden Rachenschleimhaut ließ sich der Basalzellschicht zuordnen. Ausdifferenzierte, gesunde suprabasale Zellschichten wiesen hingegen keine Expression von hnRNP H auf.

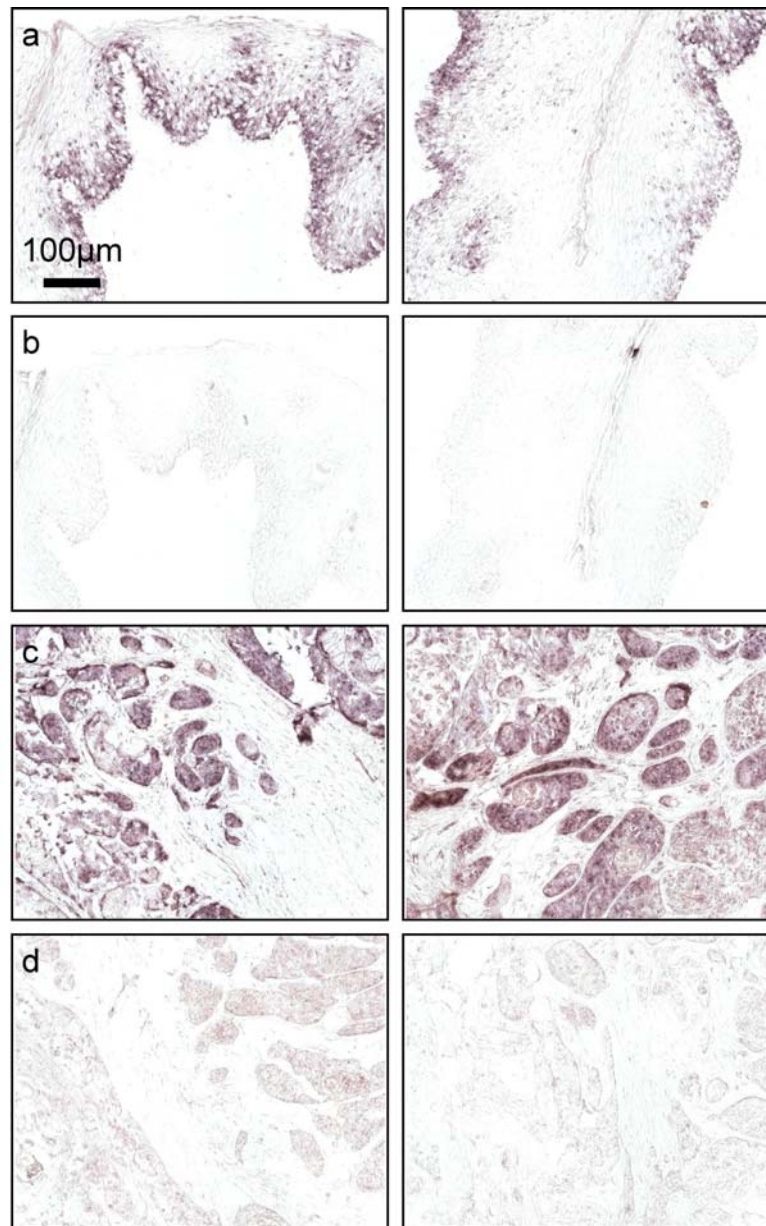


Abbildung 4.7: Expressionsmuster von hnRNP H-mRNA in gesundem Rachenepithel und primären Hals-Rachen-Karzinomen. Gefrierschnitte von gesundem Rachenepithel (a, b) und Karzinombiopsien (c, d) wurden mit einer Antisense-Sonde (hnRNP H-AS) und einer entsprechenden Sense-Sonde (hnRNP H-S) analysiert. Die AS-Sonde (hnRNP H-AS) führte beim gesunden Epithel nur zu einer schwachen Färbung in der Basalschicht (a). Die Biopsien der primären Karzinome wiesen hingegen eine sehr starke und spezifische Färbung auf (c). Die Kontrollsonde S (hnRNP H-S) ergab nur eine Hintergrundfärbung (b, d).

Mit der Verfügbarkeit eines geeigneten Antikörpers gegen hnRNP H konnten die ISH-Experimente auf Protein-Ebene wiederholt werden. Hierzu wurden ebenfalls Gefrierschnitte verschiedener Tumorbiopsien (n=13) von Patienten mit Hypopharynx- (n=5), Oropharynx- (n=5) sowie Larynxkarzinom (n=3) und als Kontrolle Gewebeproben von gesunder Rachen-schleimhaut (n=8) untersucht. Ausserdem wurden drei Lymphknotenmetastasen des Kopf-Hals-Bereiches auf ihr hnRNP H-Expressionmuster untersucht. Unabhängig von dem untersuchten Gewebe lokalisierte hnRNP H ausschließlich im Zellkern. Es zeigte sich, dass sowohl in Tumorzellen (Abbildung 4.6k) als auch in metastasierenden Zellen (Abbildung 4.6l) eine mittlere bis hohe Expression von hnRNP H im Zellkern festzustellen war. Das Expressionsmuster von hnRNP H bezüglich der relativen Anzahl hnRNP H-positiver Zellen wurde in der gesamten Biopsie statistisch ausgewertet. Bei 40% der Oropharynx-Karzinom-Biopsien zeigte sich eine Expression in 51-75% aller Zellen, in 60% der Biopsien waren nahezu alle Zellen hnRNP H-positiv (76-100%). Vier von fünf Hypopharynx-Karzinombiopsien beinhalteten 76-100% hnRNP H-positive Zellen, ebenso alle drei untersuchten Biopsien aus dem Bereich des Larynx. Zwei der drei Lymphknotenmetastasen zeigten ebenfalls eine sehr starke Expression (76-100% positive Zellen), eine Biopsie zeigte eine schwächere Expression (26-50% positive Zellen). Alle untersuchten gesunden Rachenepithelien hingegen zeigten keine oder nur eine sehr schwache Expression (0-25% aller Zellen) (Abbildung 4.6j). Diese schwache Expression ließ sich auf die Zellkerne der Basalzellschicht eingrenzen, also einer Zellschicht mit einem hohen proliferativen Potenzial. Interessanterweise war im Vergleich zu gesundem Epithel bereits in Hyperplasien eine deutlich erhöhte hnRNP H-Expression nachweisbar, die mit zunehmender Karzinogenese noch weiter anstieg. In Abbildung 4.8 ist die Biopsie eines Hypopharynxkarzinoms gezeigt, die Areale unterschiedlicher Entartungsstadien enthielt. In mikroskopisch gesundem Epithel war hnRNP H nur sehr schwach exprimiert (Abbildung 4.8a), während hyperplastisches Epithel eine starke Expression aufwies (Abbildung 4.8b). Die hnRNP H-Expression war zudem verstärkt an den Rändern der Wucherung. In bereits neoplastischen Bereichen sowie im Tumor (Tu) war eine sehr starke Expression von hnRNP H nachweisbar (Abbildung 4.8c). Die einzelnen Stufen der Karzinogenese wurden anhand der Zellmorphologie nach einer Hämatoxylin/Eosin-Anfärbung der Kerne und der zytoplasmatischen Proteine beurteilt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine starke Expression von hnRNP H aufweisen, gesunde Epithelien der gleichen Lokalisation hingegen eine schwache Expression.

Tabelle 4.8: hnRNP H-Expression in primären Kopf-Hals-Tumoren und in gesundem Rachenepithel.

Lokalisation	Expressionsmuster			
	0-25%*	26-50%*	51-75%*	76-100%*
Oropharynx	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	2/5 (40 %)	3/5 (60 %)
Hypopharynx	1/5 (20 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	4/5 (80 %)
Larynx	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	3/3 (100 %)
Metastasen	0/3 (0 %)	1/3 (33 %)	0/3 (0 %)	2/3 (67 %)
Gesunde Mucosa	8/8 (100 %)**	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)	0/8 (0 %)

*Prozent hnRNP H-positiver Zellen in Biopsie.

**Eine Ausnahme bildet die Basalzellschicht, wo hnRNP H stets exprimiert ist.

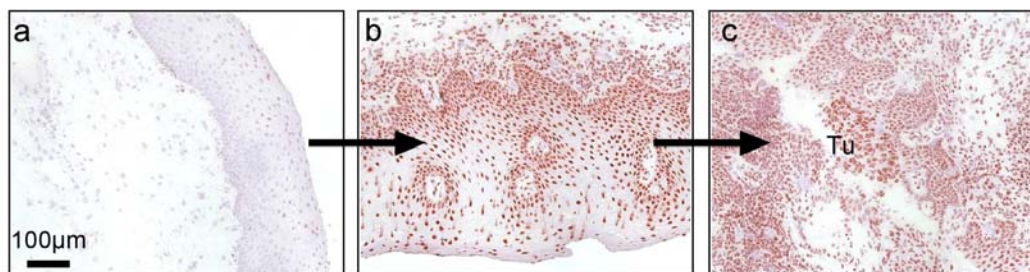


Abbildung 4.8: hnRNP H-Expression in gesundem Rachenepithel, Hyperplasie und Karzinom. Gefrierschnitte einer autologen Tumorbiopsie wurden mit einem hnRNP H-spezifischen Antikörper in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper gefärbt. Gezeigt sind verschiedene Bereiche der Biopsie eines Hypopharynxkarzinompatienten. Gesundes Epithel (a), der Übergang zur Hyperplasie (b) und der Übergang zum Karzinom (Tu) (c) zeigten eine ansteigende hnRNP H-Expression.

4.1.4. Expressionsprofile des potenziellen Tumorantigens hnRNP H

Es stellte sich die Frage, in welchem Ausmaß hnRNP H in anderen Geweben und Tumorentitäten exprimiert ist. Dazu wurde zunächst die mRNA-Expression für hnRNP H in humanen Zelllinien mittels RT-PCR semiquantitativ bestimmt. Gesamt-RNA aus verschiedenen humanen Zelllinien (HEK293, ANT-1, PCI-1, FaDu, GHD, PCI-13, SK-BR-3, HeLa, A549, Fibroblasten) wurde mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und dann auf die Expression des hnRNP H-Transkriptes mit spezifischen Oligonukleotidprimern untersucht. Es stellte sich heraus, dass hnRNP H in allen getesteten Karzinomzelllinien des Hals-Rachen-Raumes (ANT-1, PCI-1, FaDu, GHD, PCI-13) exprimiert wird (Abbildung 4.9). Auch alle weiteren getesteten Zelllinien HEK-293 (embryonale Niere), SK-

BR-3 (Mamma-Karzinom), HeLa (Zervix-Karzinom), A549 (Lungen-Karzinom) sowie eine Fibroblasten-Zelllinie zeigten die Expression von hnRNP H auf Transkript-Ebene.

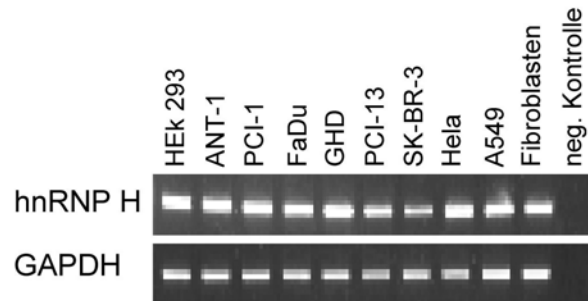


Abbildung 4.9: hnRNP H-mRNA-Expression in Zelllinien. Die Gesamt-RNA wurde aus Zelllinien humanen Ursprungs isoliert und in einer RT-PCR auf die Expression hnRNP H-Transkriptes untersucht. Neg. Kontrolle: H₂O-Negativ-Kontrolle.

Neben den oben dargestellten Zelllinien sollten auch humane Gewebe auf die hnRNP H-Expression untersucht werden. Dazu wurden Gefrierschnitte humaner, morphologisch gesunder Gewebe (n=11) auf ihre hnRNP H-Expression mittels immunhistochemischer Analysen untersucht (Abbildung 4.10a-k). Als Positiv-Kontrolle für eine starke hnRNP H-Expression diente eine Hypopharynxkarzinom-Biopsie, welche bereits mehrfach von uns untersucht wurde (Abbildung 4.10l). Es konnte gezeigt werden, dass einige Organe keine (Herz) bzw. eine sehr geringe (Muskel, Leber, Niere, Pankreas) Expression von hnRNP H aufwiesen. Einige Gewebe hingegen zeigten eine robuste Expression, die aber oft auf einen Zelltyp beschränkt war. So zeigten im Magenepithel Schleimhautdrüsen eine hohe Expression, im untersuchten Darmepithel fand sich in den proliferierenden Zellen oberhalb der Submucosa eine erhöhte Expression von hnRNP H. Im Drüsenepithel des Prostata-Gewebes war in einigen Zellen eine geringe hnRNP H-Expression nachweisbar. Ebenso zeigten viele Zellen in den Geweben Lunge, Milz sowie Testis eine starke hnRNP H-Expression. In diesen Gewebebiopsien konnte jedoch keine eindeutige Zuordnung zu bestimmten Zelltypen erfolgen.

Neben dem Expressionsprofil in gesunden Geweben sollte außerdem die Frage beantwortet werden, ob neben HNO-Karzinomen andere ausgewählte Tumorentitäten eine erhöhte Expression von hnRNP H aufweisen. Dazu wurden Gefrierschnitte von Karzinombiopsien der Entitäten Darm, Pankreas sowie Brustgewebe und - sofern verfügbar - entsprechende gesunde Gewebe auf ihre hnRNP H-Expression mittels IHC untersucht (Abbildung 4.11). So konnte gezeigt werden, dass auch bei Kolonkarzinomen (Abbildung 4.11b) im Vergleich zu gesunder Darmschleimhaut (Abbildung 4.11a) eine erhöhte hnRNP H-Expression auftritt.

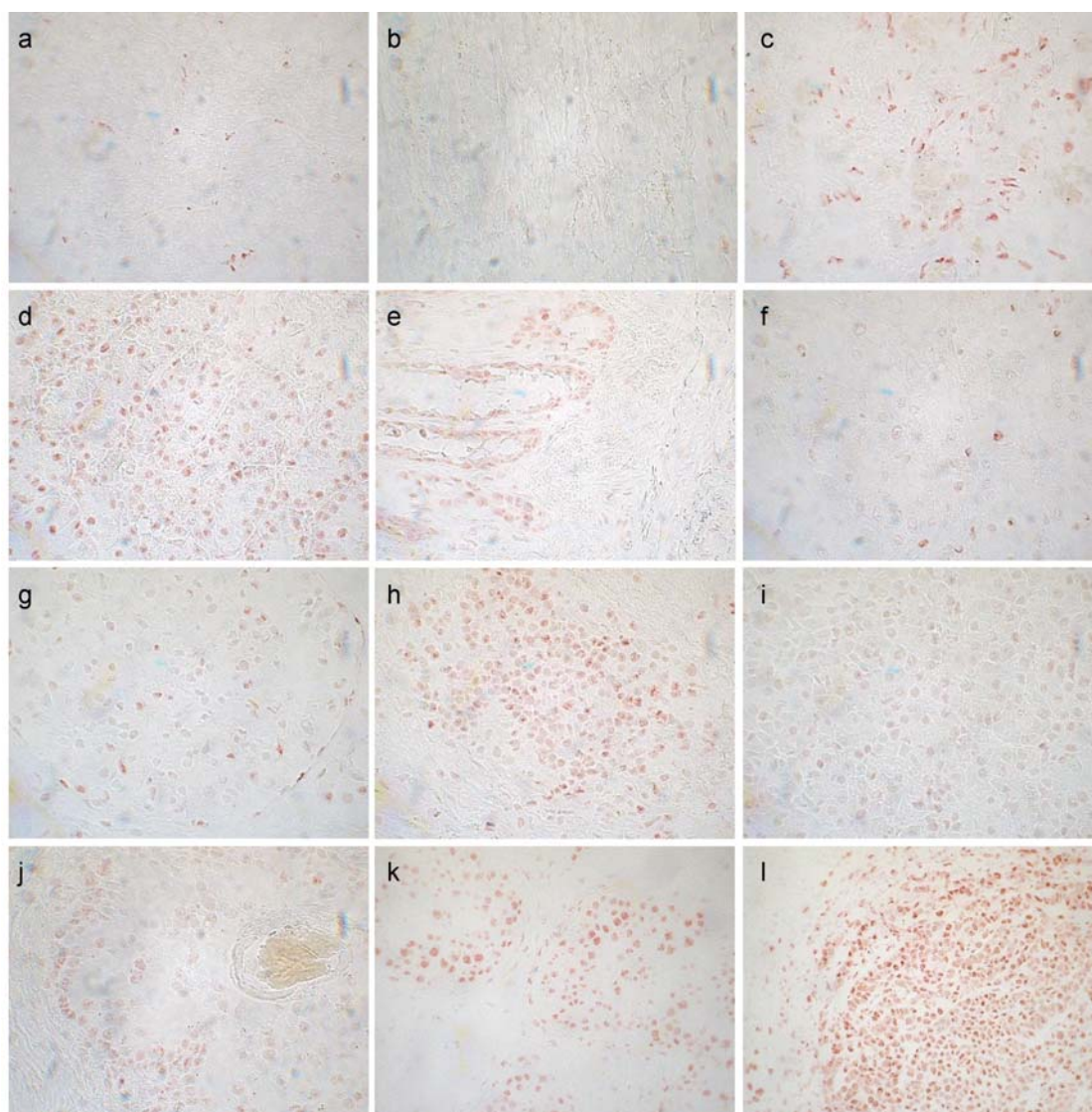


Abbildung 4.10: hnRNP H-Expression in ausgewählten, morphologisch gesundem Geweben. Gefrierschnitte von Gewebebiopsien wurden mit einem spezifischen Antikörper für hnRNP H in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper gefärbt: Längsgestreifte Muskulatur (a), Quergestreifte Herzmuskulatur (b), Lunge (c), Magenschleimhaut (d), Darmepithel (e), Leber-Hepatozyten (f), Nierentubuli (g), Milz (h), Pankreas exokriner Teil (i), Prostata Drüsenepithel (j), Testis (k). Hypopharynx-Karzinom als Positiv-Kontrolle (l). Vergrößerung (a-k) 520-fach, (l) 260-fach.

In gesunder Darmschleimhaut fanden sich hnRNP H-positive Zellen oberhalb der Submucosa. Bei Pankreaskarzinombiopsien zeigte sich ebenfalls eine robuste Expression (Abbildung 4.11d), bei entsprechendem gesundem Gewebe hingegen war die hnRNP H-Expression auf Zellen der Ausführungsgänge und seröse Acini im Bereich der Ausführungsgänge beschränkt (Abbildung 4.11c). Tumorzellen einer Mammakarzinom-Biopsie zeigten ebenfalls eine hohe Expression des Proteins (Abbildung 4.11e).

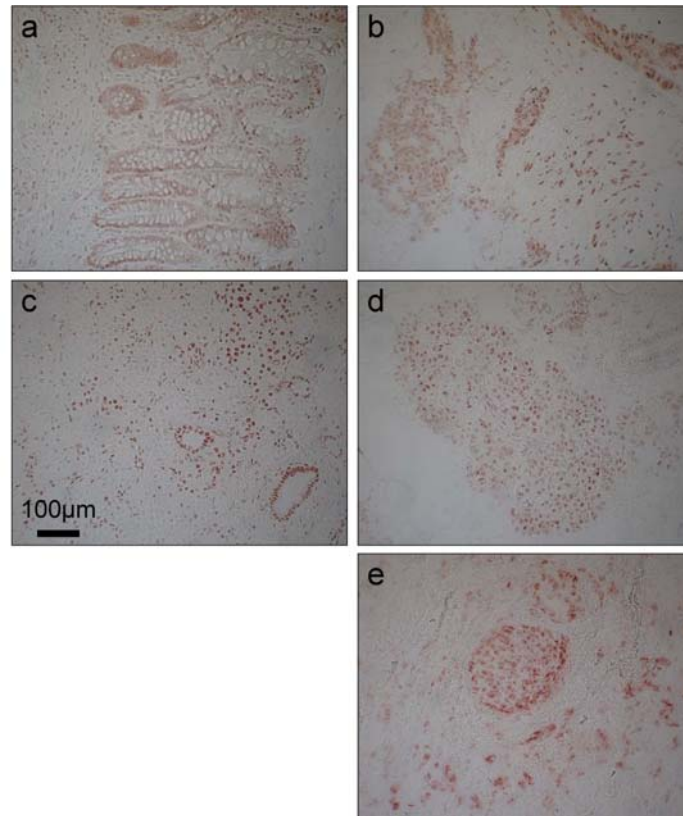


Abbildung 4.11: hnRNP H-Expression in morphologisch gesundem Geweben und Karzinomen der gleichen Lokalisation. Gefrierschnitte der Gewebebiopsien wurden mit einem spezifischen Antikörper für hnRNP H in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper gefärbt: Darmepithel (a), Kolon-Karzinom (b), Pankreas (c), Pankreas-Karzinom (d), Mamma-Karzinom (e)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine sehr starke Expression des Proteins hnRNP H aufwiesen. Dies traf ebenso auf die weiteren untersuchten Karzinomentitäten (Zelllinien und Gewebe) zu. Die Expression in nicht-malignen Geweben war sehr heterogen. Neben Geweben, die nahezu keine Expression aufwiesen (Muskel, Leber, Niere, Pankreas), waren in einigen Geweben auch Zellen mit hoher hnRNP H-Expression zu beobachten (Lunge, Magen, Darm).

4.2. Funktionelle Analysen des Tumorantigens hnRNP H

Die oben durchgeführten Analysen zeigten, dass hnRNP H in einigen Tumorentitäten stark überexprimiert ist. Die Überexpression von hnRNP H ist eine mögliche Ursache für die Ausbildung einer humoralen Antwort und damit ein möglicher Grund für die Identifizierung des Proteins mit Hilfe der allo-AMIDA Methode.

hnRNP H gehört zu einer Unterklasse pre-mRNA-bindender Proteine (Krecic and Swanson, 1999). Die Gruppe der *heterogenous ribonucleoproteins* (hnRNPs) ist eine Proteinfamilie, die am Metabolismus von RNAs beteiligt ist. Es wurde beschrieben, dass hnRNP H am zelltyp-abhängigen, alternativen Spleißen von mindestens zwei prä-mRNAs beteiligt ist: *c-src* prä-mRNA in neuronalen Zellen (Chou *et al.*, 1999) und beta-tropomyosin prä-mRNA in Muskelzellen (Ratte) (Chen *et al.*, 1999). Derzeit wird in der Literatur kontrovers diskutiert, ob hnRNP H beim alternativen Spleissen von prä-mRNAs als sog. Exon-Spleiß-Silencer (ESS) oder Intron-Spleiß-Enhancer (ISE) fungiert (Matlin *et al.*, 2005).

Es stellte sich nun die Frage, weshalb dieses nukleäre Protein eine erhöhte Expression in Karzinomen aufweist. Zudem ist *bis dato* wenig über die Funktion des Proteins bekannt. Im Folgenden sollten diese Fragestellungen detaillierter analysiert werden.

4.2.1. Etablierung eines zellulären Systems zur funktionellen Untersuchung von hnRNP H

Wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt, wiesen alle von uns analysierten permanenten Karzinomzelllinien eine starke hnRNP H-Expression auf. Es stellte sich die Frage, ob eine Überexpression, also die Nachahmung der *in vivo*-Situation, Auswirkungen auf die Zellen hat. Eine weitere starke Erhöhung der hnRNP H-Expression mittels verschiedener eukaryotischer Expressionssysteme (pcDNA3.1 und 141-pCAG) konnte jedoch aufgrund der bereits hohen endogenen Expression experimentell nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur funktionellen Charakterisierung sollte daher ein zelluläres System zur Inhibition der hnRNP H-Expression etabliert werden. Dazu wurde die Expression in Zelllinien mittels small-interfering RNA (siRNA)-Oligonukleotiden transient reprimiert. Drei siRNAs, die unterschiedlichen Regionen der hnRNP H mRNA entsprechen, wurden getestet (Abbildung 4.12a). Die drei siRNAs wiesen laut BLAST-Sequenz-Analyse keine Homologien zu anderen humanen mRNA-Regionen auf. Zunächst wurde die jeweilige Effizienz der siRNAs, hnRNP H-mRNA zu reprimieren, untersucht. Dazu wurden in separaten Ansätzen HeLa-Zellen transient mit den drei siRNAs (je 100nM / 300.000 Zellen) transfiziert und die Gesamt-RNA 24h, 48h und 72h nach Transfektion isoliert.

Die Repression der hnRNP H-mRNA wurde mittels RT-PCR relativ quantifiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Für die Transfektion der Zellen wurde ein neuartiges Transfektionsreagenz (MATRA-A) verwendet. Nach Anga-

ben des Herstellers werden die zu transfizierenden Nukleinsäuren zunächst an kleine paramagnetische Nanopartikel gebunden. Mit Hilfe eines starken Magnetfeldes werden diese Komplexe durch die adhären den Zellen gezogen. Die siRNA löst sich hierbei von den Nanopartikeln und verbleibt in der Zelle.

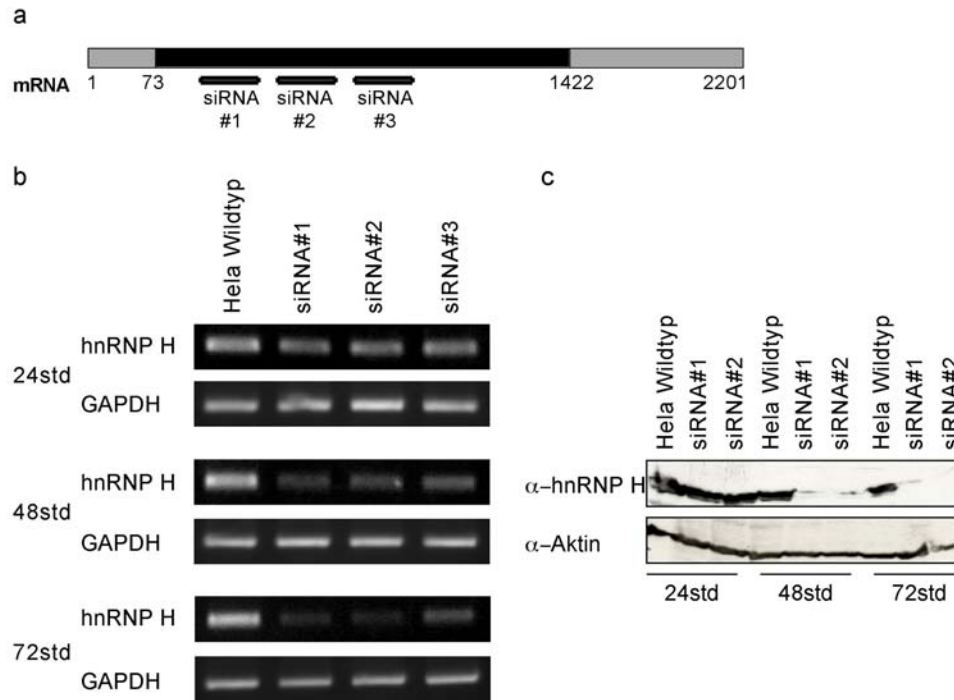


Abbildung 4.12: Repression der hnRNP H-Expression mittels siRNA-Oligonukleotiden. (a) Sequenzregionen der siRNAs auf der hnRNP H-mRNA (NCBI: NM_005520). Gesamt-mRNA: 2201bp, Codierende Region (CDS): bp 73-1422. siRNA#1: bp 438-613, siRNA#2: bp 594-613, siRNA#3: bp 743-762. bp Basenpaare. (b) Semiquantitative Messung der hnRNP H-Repression mittels RT-PCR. siRNAs, die verschiedenen Regionen der hnRNP H-mRNA-Sequenz entsprechen, wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 24h, 48h und 72h wurde die Menge an hnRNP H-mRNA mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente die RT-PCR auf GAPDH. (c) Relative Quantifizierung der hnRNP H-Protein-Menge mittels Western-Blot. 24h, 48h und 72h nach Transfektion mit siRNAs wurde die Menge an hnRNP H mittels spezifischem Antikörper gegen hnRNP H im Western Blot bestimmt. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde, neben der Proteinquantifizierung mit dem BCA-Test, ein Immunoblot gegen Actin durchgeführt. Gezeigt sind in b und c die repräsentativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 4.12 zeigt die Repression der Transkriptmengen von hnRNP H. 24h nach Transfektion war eine schwache Repression durch alle drei siRNAs erkennbar. Nach 48h erzielten die siRNAs #1 und #2 eine deutliche Reduktion der mRNA-Menge. Dieser Effekt wurde nach 72h noch verstärkt, wobei die Transfektion mit siRNA#1 die effizienteste Inhibierung der mRNA-Menge zur Folge hatte. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse auf Transkript-Ebene wurden die siRNAs #1 und #2 für einen weiteren Test auf Protein-Ebene verwendet. Dazu wurden ebenfalls HeLa-Zellen transient mit den zwei siRNAs (100nM/ 300.000 Zellen) transfiziert und die Zellen 24h, 48h und 72h nach Transfektion isoliert und lysiert. Die Inhibierung

der hnRNP H-Proteinexpression in den Lysaten wurde mittels Western Blot untersucht (Abbildung 4.12c). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl siRNA#1 als auch siRNA#2 die hnRNP H-Proteinexpression nach 48h und 72h reprimieren. Für alle folgenden Versuche wurde die siRNA#1 verwendet. Um die Effizienz der siRNA-Transfektion zu testen, wurden HeLa Zellen transient mit siRNA#1 (100nM /300.000 Zellen pro 6-Lochplatte) transfiziert und die hnRNP-Expression über einen Zeitraum von fünf Tagen beobachtet. Wie Abbildung 4.13 zu entnehmen, zeigte sich bereits nach zwei Tagen eine deutliche Repression der hnRNP H-Proteinmenge. Diese Repression blieb bis einschließlich Tag vier nach Transfektion erhalten, so dass dieser Zeitraum für alle weiteren Experimente gewählt wurde. Bei Verwendung einer spezifischen hnRNP H-Kontroll-siRNA (Ktrl. siRNA), bei der alle 19 Basen der ursprünglichen siRNA#1 neu angeordnet sind, zeigte sich erwartungsgemäß keine Veränderung der hnRNP H-Expression. Gleiches gilt für die Transfektionskontrolle, bei der HeLa-Zellen ausschließlich mit Transfektionreagenz (*i.e.* ohne siRNA) transfiziert wurden.

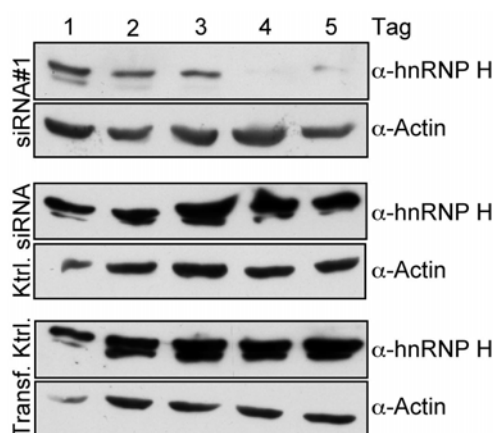


Abbildung 4.13: Repression der hnRNP H-Proteinexpression mittels siRNA. HeLa-Zellen wurden mit 100nM siRNA#1 transient transfiziert (300.000 Zellen/ 6-Lochplatte). Als Kontrolle dienten die Transfektion mit 100nM Ktrl. siRNA und die Transfektion ohne siRNA (Transf. Ktrl). Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde die Menge an hnRNP H Protein mittels spezifischem Antikörper gegen hnRNP H im Western Blot semiquantitativ bestimmt. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen wurde, neben der Proteinquantifizierung mit BCA, ein Immunoblot gegen Actin durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten.

Um die Effizienz der neuen Transfektionsmethode zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen mit siRNAs transfiziert, welche 5'-terminal mit Fluorescein konjugiert waren. 24 Stunden nach Transfektion wurde der Anteil Fluorescein-positiver Zellen, *i.e.* transfizierter Zellen, mittels Durchflußzytometrie bestimmt (Abbildung 4.14). Wie Abbildung 4.14d zu entnehmen ist, wurden sowohl mit siRNA#1 als auch mit Ktrl.siRNA über 83% der Zellen transfiziert.

Auf der Basis dieser sehr hohen Transfektionsrate und der effektiven Repression der hnRNP H-Expression konnten nun weitere Experimente im etablierten Zellsystem durchgeführt werden.

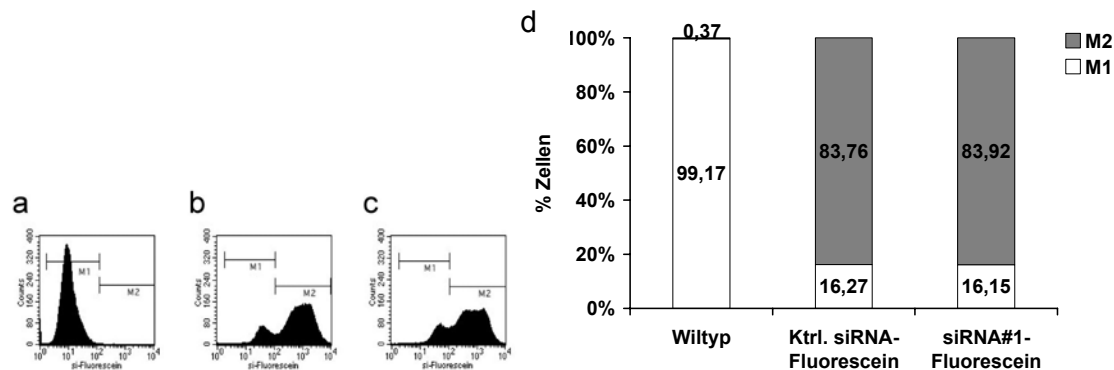


Abbildung 4.14: Bestimmung der Transfektionseffizienz von siRNA-Molekülen. HeLa-Zellen wurden mit 100nM 5'-Fluorescein-konjugierter siRNA#1 (c) bzw. Ktrl.-siRNA (b) transient transfiziert (à 300.000 Zellen). 24h nach Transfektion wurde die relative Anzahl Fluorescein-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Als Kontrolle dienten untransfizierte HeLa-Zellen (a). Relative Quantifizierung transfizierter Zellen (d).

4.2.2. Auswirkungen der hnRNP H-Repression auf Zelldichte, Zellzahl und Vitalität

Bei der oben beschriebenen Etablierung zur Untersuchung der Auswirkungen der hnRNP H-Repression in Karzinomzelllinien konnte folgendes Phänomen beobachtet werden: Nach Transfektion von Zelllinien mit siRNA#1 zeigte sich nach ca. drei Tagen ein deutlich vermindertes Wachstum im Vergleich zu Zelllinien, die mit Ktrl. siRNA behandelt wurden bzw. den Transfektionskontrollen. Im Folgenden sollte diese Beobachtung detaillierter untersucht werden. Dazu wurden die Karzinomzelllinien GHD, HeLa sowie die embryonale Nierenzelllinie HEK-293 mit siRNA#1 transfiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ktrl. siRNA oder ausschließlich mit Transfektionseagens behandelt. Abbildung 4.15 zeigt repräsentativ die jeweiligen Zelldichten an Tag vier nach Transfektion. Die Repression von hnRNP H in den Zelllinien GHD und HeLa führte zu einem verminderten Wachstum. Bei HEK-293 Zellen konnte kein verändertes Wachstum festgestellt werden. Zudem wurde beobachtet, dass nach einer Repression von hnRNP H in den Zelllinien GHD und HeLa überdurchschnittlich viele Zellen nicht mehr adhären waren, sondern sich im Zellüberstand befanden.

Um die Wachstumsreduktion quantitativ erfassen zu können, wurden die Zelllinien GHD, HeLa und HEK-293 jeweils mit 100nM siRNA#1, 100nM Kontroll-siRNA und Transfektionsreagenz (Transfektionskontrolle) transfiziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer täglich bestimmt. Trypanblau diente

dabei als Farbstoff, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind an ihrer blauen Farbe erkennbar. Für die Zellzahlbestimmung wurden ausschließlich lebende Zellen herangezogen. Alle ermittelten Zahlen beziehen sich auf die Zellzahl 24 h nach transients Transfektion der jeweiligen siRNA-Moleküle.

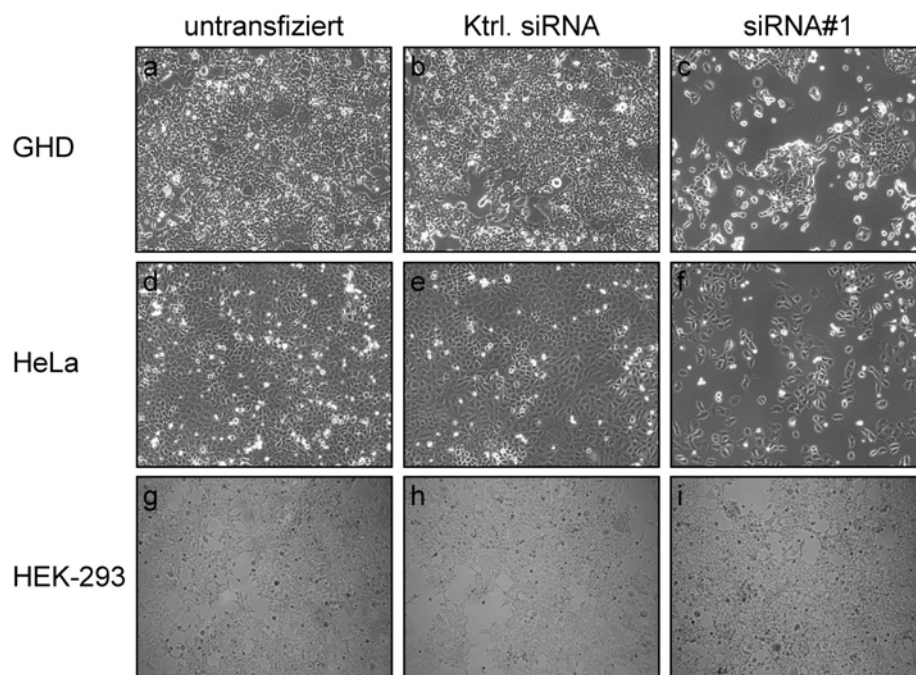


Abbildung 4.15: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Zelldichte nach Behandlung mit siRNAs. Die Zelllinien GHD (a-c), HeLa (d-f) und HEK-293 (g-i) wurden mit Ktrl. siRNA (100nM/ 300.000Zellen) (b,e,h), siRNA#1 (100nM/ 300.000Zellen) (c,f,i) oder mit Transfektionsreagenz transient transfiziert. Nach 4 Tagen wurde die Zelldichte im Durchlichtmikroskop beobachtet. Vergrößerung: 260fach

Abbildung 4.16 zeigt das Ergebnis dieser Kinetik aus zwei unabhängigen Experimenten. GHD-Zellen zeigten bis zum Tag drei keinen signifikanten Unterschied im Wachstum. Nach vier Tagen zeigten Zellen mit reprimierter hnRNP H-Expression eine verminderte relative Zellzahl (4,1) im Vergleich zu Transfektionskontrolle (10,4) bzw. Kontroll-siRNA (9,2). Nach fünf Tagen ergab sich in zwei unabhängigen Ansätzen reproduzierbar eine um den Faktor 3,9 verminderte Zellzahl im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen. Ähnliche Auswirkungen auf die Zellzahl wurden nach der Transfektion von HeLa-Zellen festgestellt. Bei Repression von hnRNP H zeigte sich am Tag fünf ein Wachstums-koeffizient von 1,6, während beide Kontroll-Zellen ein 6,9-faches (Transfektionskontrolle) bzw. 7,8-faches (Kontroll-siRNA) Wachstum aufwiesen (Abbildung 4.16c). Wie Abbildung 4.16e zu entnehmen ist, hatte eine Repression von hnRNP H in HEK-293-Zellen keine signifikanten Auswirkungen

auf die Zellzahl. Aus den oben gezeigten Zellzahlkinetiken ließen sich die entsprechenden Verdoppelungszahlen berechnen (Tabelle 4.4).

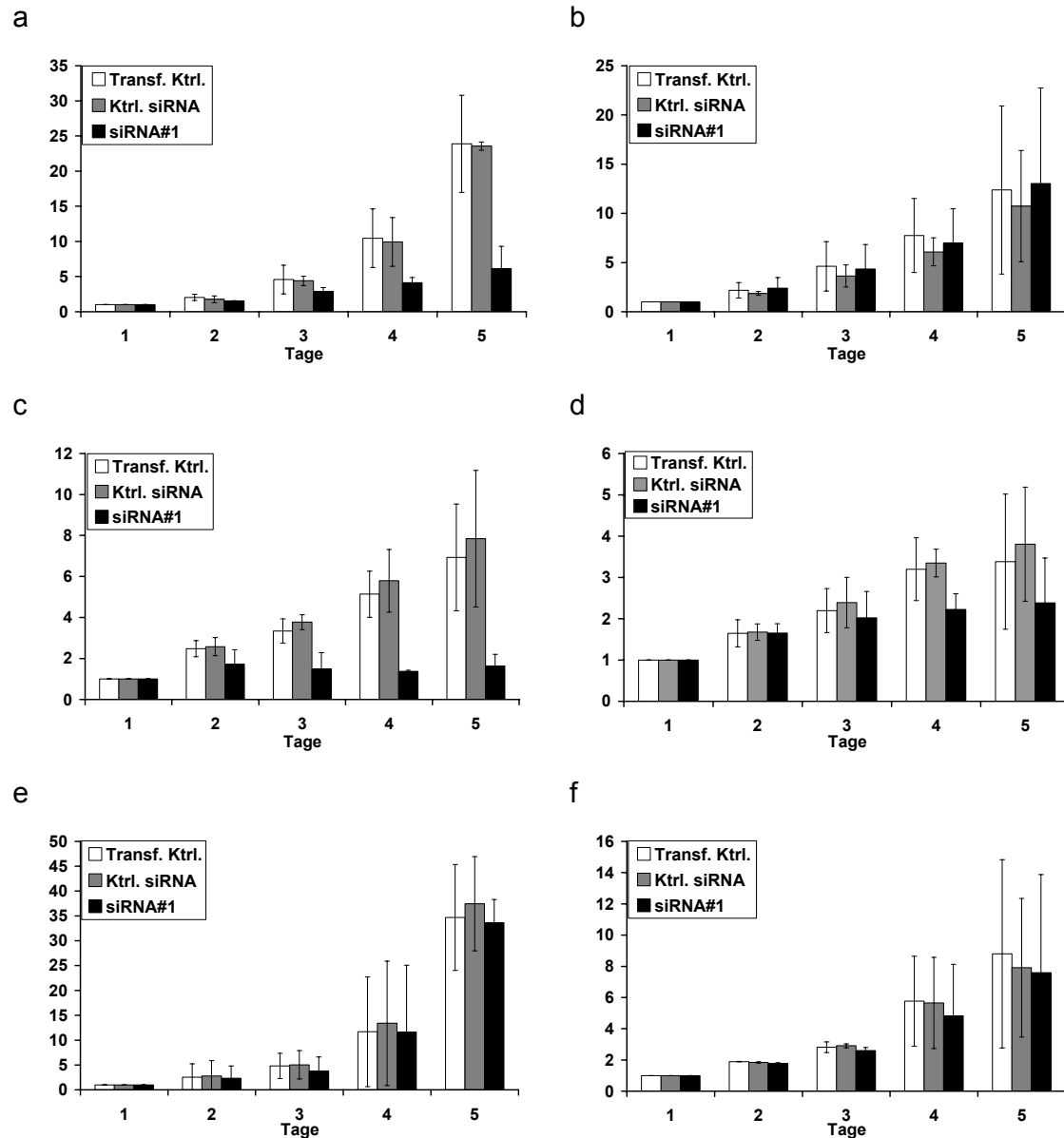


Abbildung 4.16: Auswirkungen der hnRNP H-Repression auf Zellteilungsrate und metabolische Aktivität. Die Zelllinien GHD (a, b), HeLa (c, d) und HEK-293 (e, f) wurden mit Ktrl. siRNA (100nM/ 300.000 Zellen), siRNA#1 (100nM/ 300.000 Zellen) bzw. Transfektionsreagenz transient transfiziert. Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde die relative Zellzahl (a, c, e) mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Die relative metabolische Aktivität der Zellen wurde mit Hilfe eines MTT-Konversionsexperimentes bestimmt (b, d, f). Alle Werte sind auf den Tag 1 nach Transfektion bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

GHD-Zellen mit verminderter hnRNP H-Expression zeigten eine erhöhte Verdoppelungszahl von 1,5 Tagen, *i.e.* eine verringerte Proliferationsrate. Bei den mitgeführten Kontrollen hingegen lag die Verdoppelungszahl bei 0,9 Tagen. Bei HeLa-Zellen führte die von hnRNP H zu

einer drastisch erhöhten Verdoppelungszahl von 5,9 Tagen (Kontrollen 1,3-1,4 Tage). HEK-293 zeigten keine Veränderungen der Verdoppelungszahl (0,8 Tage).

Parallel zu diesen Experimenten wurden die Auswirkungen der hnRNP H-Repression auf den Zellmetabolismus studiert. Dazu wurden die Zelllinien GHD, HeLa und HEK-293 zu gleichen Zellzahlen (3000 Zellen/ Loch in 96-Lochplatten) jeweils mit 100nM siRNA#1, 100nM Kontroll-siRNA und Transfektionsreagenz (Transfektionskontrolle) transfiziert. Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde die metabolische Aktivität täglich in einem Standard MTT-Konversionsexperiment bestimmt. In den Abbildungen 4.16b, d und f sind die relativen Werte der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt (zwei unabhängige MTT-Konversionsexperimenten). Die ermittelte optische Dichte ist ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen. Alle ermittelten Zahlen beziehen sich auf die optische Dichte an Tag eins nach Transfektion. Bei GHD-Zellen (Abbildung 4.16b) zeigte sich keine signifikante Auswirkung der hnRNP H-Repression auf die metabolische Aktivität. HeLa-Zellen mit verminderter hnRNP H-Expression (Abbildung 4.16d) zeigten einen leicht reduzierten Metabolismus ab Tag drei (Faktor 1-1,4 an Tag 5). Bei HEK-293-Zellen (Abbildung 4.16f) war nach der Repression von hnRNP H keine Auswirkung auf den Metabolismus zu beobachten.

Tabelle 4.4: Verdoppelungszahlen von GHD-, HeLa- und HEK-293-Zellen nach Transfektion mit Ktrl. siRNA, siRNA#1 bzw. Transfektionskontrolle. Die Verdoppelungszeit t_D ist die Zeit in Tagen, in der sich eine gegebene Zellzahl verdoppelt.

	Transf. Ktrl. (Tage)	Ktrl. siRNA (Tage)	siRNA#1 (Tage)
GHD	0,9	0,9	1,5
HeLa	1,4	1,3	5,9
HEK-293	0,8	0,8	0,8

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass die Repression von hnRNP H mittels spezifischen siRNAs zu einer drastisch reduzierten Zellzahl von GHD- und HeLa-Zellen führte. Eine Behandlung der HEK-293-Zellen zeigte keine signifikanten Auswirkungen.

Um sicherzustellen, dass diese Effekte tatsächlich aufgrund der reduzierten Menge an hnRNP H auftraten und nicht methodisch bedingt waren, wurden Komplementationsexperimente durchgeführt. Hierzu sollte die Repression von hnRNP H und die damit einhergehende Reduktion der Zellzahl durch die Ko-Transfektion mit einem Expressionsplasmid komplementiert werden. Da die Wirkung von siRNAs konzentrationsabhängig ist, wurden HeLa-Zellen jeweils mit 10nM, 50nM und 100nM siRNA#1 transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Zusätzlich zu den drei verschiedenen siRNA-Konzentrationen

wurden die Zellen jeweils mit dem Überexpressionsplasmid 141pCAG::hnRNP H (1µg) bzw. einem Kontrollplasmid 141pCAG (1µg) transfiziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde die relative Zellzahl, wie oben beschrieben, täglich bestimmt. Abbildung 4.17 zeigt ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Ansätzen. Bei einer Konzentration von 100nM siRNA#1 zeigte sich erwartungsgemäß eine deutliche Reduzierung der Zellzahl (2,4-fache Zellzahl am Tag 5) im Vergleich zur Kontrolle (14,3-fache Zellzahl). Eine Umkehr des Phänotyps durch das Expressionsplasmid 141pCAG::hnRNP H war nicht zu beobachten (2,6-fache Zellzahl). Wurden die Zellen mit 50nM siRNA#1 behandelt, so zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der Zellzahl (2,9-fache Zellzahl am Tag fünf versus 14,3-fach bei der Kontrolle), jedoch konnte diese Reduktion durch Ko-Transfektion mit dem Überexpressionsplasmid vollständig kompensiert werden (17,8-fache Zellzahl). Diese Komplementierung war über den gesamten Messzeitraum von fünf Tagen zu beobachten.

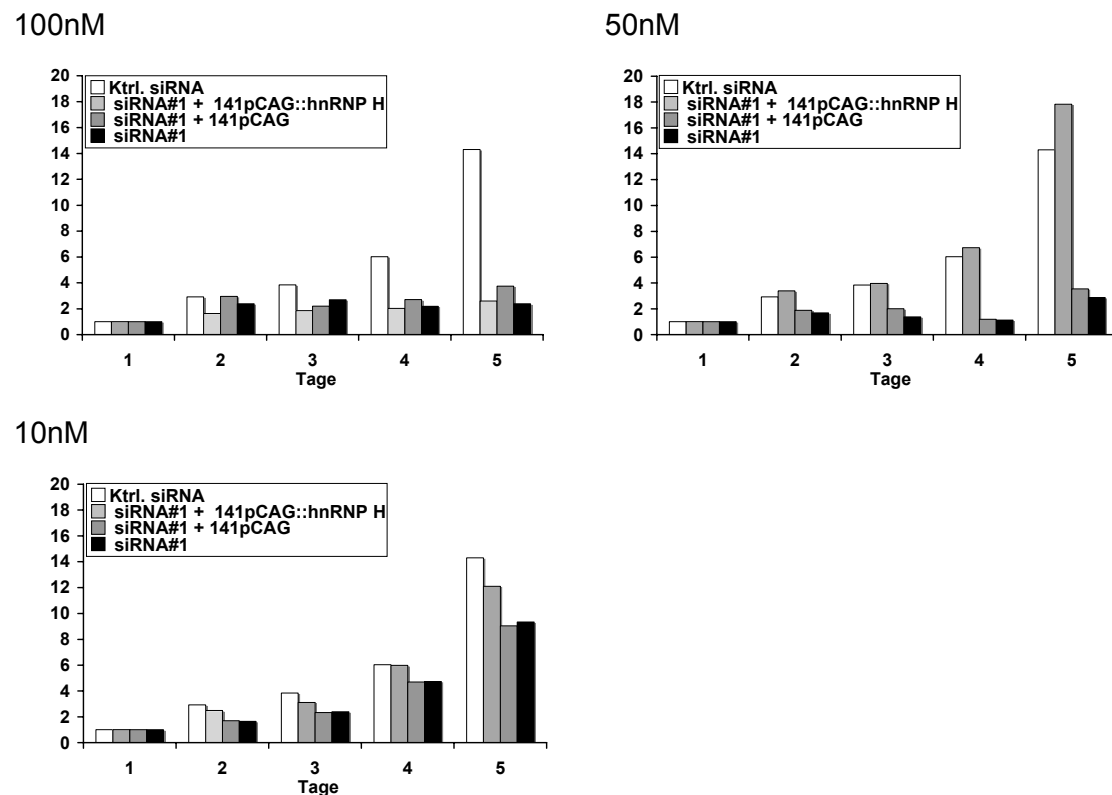


Abbildung 4.17: Komplementierung der Reduktion des Zellwachstums nach hnRNP H-Repression. Die Zelllinie HeLa wurde mit Ktrl. siRNA (100nM/ 300.000 Zellen) bzw. jeweils 3 verschiedenen Konzentrationen siRNA#1 (100nM, 50nM oder 10nM / 300.000 Zellen) transient transfiziert. Zur Komplementierung wurden die Zellen mit dem Überexpressionsplasmid 141pCAG::hnRNP H ko-transfiziert (1µg / 300.000 Zellen). Als Kontrolle diente das Plasmid 141pCAG. Über einen Zeitraum von 5 Tagen nach Transfektion wurden die relativen Zellzahlen (a, c, e) mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Als Kontrolle diente die Ko-Transfektion mit dem Leerplasmid 141pCAG (3,5-fache Zellzahl). Bei einer Konzentration von 10nM siRNA#1 zeigte sich eine verminderte Reduktion der Zellzahl am Tag fünf (9,3-fache Zellzahl). Auch bei dieser Konzentration ließ sich eine Komplementierung durch das Überexpressionsplasmid messen (12,1-fache Zellzahl am Tag fünf).

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass eine Reduktion von hnRNP H in Karzinomzelllinien dosisabhängig mit einer verminderten Wachstumsrate einhergeht. Dieser Effekt konnte durch die Überexpression von hnRNP H komplementiert werden und war somit spezifisch. Ausserdem wurde beobachtet, dass durch die Repression von hnRNP H viele Zellen nicht mehr adhärend wuchsen. Ziel der folgenden Kapitel war es daher, zu analysieren, worauf dieser Phänotyp beruhte.

4.2.3. hnRNP H-Repression induziert Apoptose in Karzinomzelllinien

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Repression von hnRNP H Auswirkungen auf den Zellzyklus von Karzinomzelllinien hat und dies die Ursache für den oben beschriebenen Phänotyp war. Die Analysen der Zellzyklusverteilung wurden mit Hilfe einer Propidiumiodid-Färbung und der Durchflusszytometrie (PI-FACS) durchgeführt. Dazu wurden GHD- und HeLa-Zellen zu gleichen Zellzahlen jeweils mit 100nM siRNA#1, 50nM siRNA#1 bzw. 100nM Kontroll-siRNA transfiziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde nun die PI-FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zunächst fixiert und die zelluläre RNA enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die Zellen mit PI gefärbt, das in die chromosomale DNA interkalieren kann. Die Menge an interkaliertem PI kann durchflusszytometrisch erfasst werden. Aus der Menge PI pro Zelle kann die Anzahl der Chromosomensätze und somit die Zellzyklusphasenverteilung bestimmt werden. Abbildung 4.18 zeigt exemplarisch ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. Die erste Kurve der Histogramme repräsentiert Zellen, die sich in der G₁- bzw. G₀-Phase (einfacher Chromosomensatz) befinden, die zweite beinhaltet Zellen, die sich in der G₂/M-Phase des Zellzyklus befinden (zweifacher Chromosomensatz). Zwischen diesen Kurven befinden sich Zellen, die in der S-Phase sind. Vor dem G₁/G₀-Peak befinden sich apoptotische Zellen, auch als sub-G₁ bezeichnet, da die DNA bereits degradiert ist. Bei Reduktion von hnRNP H (100nM siRNA#1) in GHD-Zellen konnte ein Anstieg apoptotischer Zellen im sub-G₁-Bereich ab Tag drei beobachtet werden (4,4% der Zellen). Diese Zahl stieg weiter bis auf 21,9% der Zellen. Im Vergleich dazu fanden sich bei den Kontroll-Zellen 1,9 bis 2,6% in diesem Bereich. Bei Behandlung der Zellen mit einer geringeren Konzentration von 50nM siRNA#1 befanden sich 7% der Zellen im sub-G₁-Bereich.

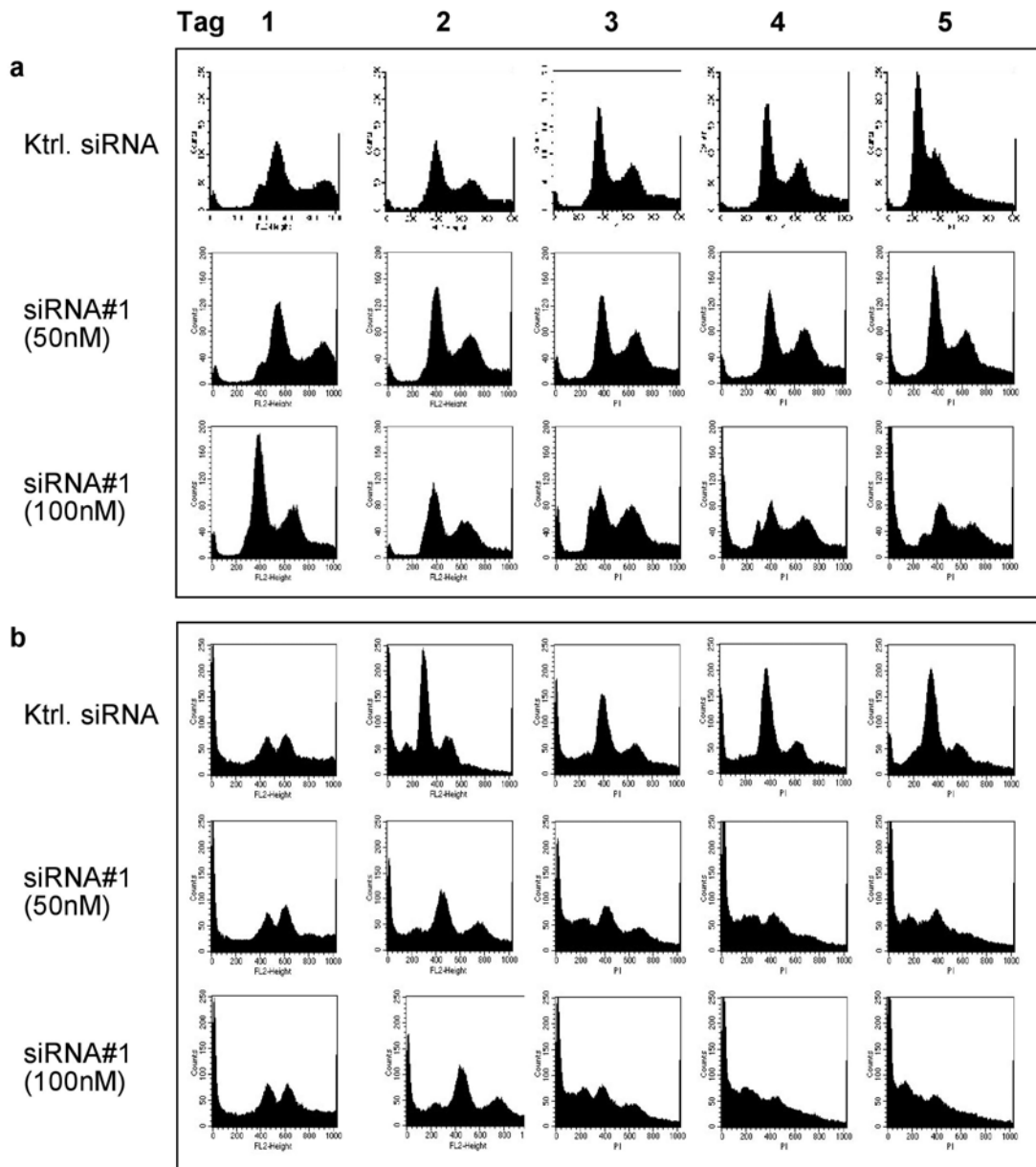


Abbildung 4.18: Analyse der Zellzyklusverteilung in GHD- und HeLa-Zellen bei Repression von hnRNP H. GHD (a)- bzw. HeLa-Zellen (b) wurden mit 100nM Ktrl. siRNA, 50nM siRNA#1 bzw. 100nM siRNA#1 transient transfiziert. Mittels Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS) wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen die Zellzyklusverteilung der Zellen analysiert. Analysiert wurden jeweils 50.000 Zellen, die Messungen des spezifischen PI-Gehaltes der Zellen werden in linearen Histogrammen wiedergegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen mit jeder Zelllinie.

Nach der Repression von hnRNP H in HeLa-Zellen mittels 100nM siRNA#1 befanden sich nach fünf Tagen 51,3% der Zellen im sub-G₁-Bereich. Dieser starke Anstieg war ab Tag drei nach der Transfektion mit spezifischer siRNA zu beobachten. Auch bei einer Konzentration von 50nM siRNA#1 fanden sich am Tag fünf 43,9% der Zellen im sub-G₁-Bereich.

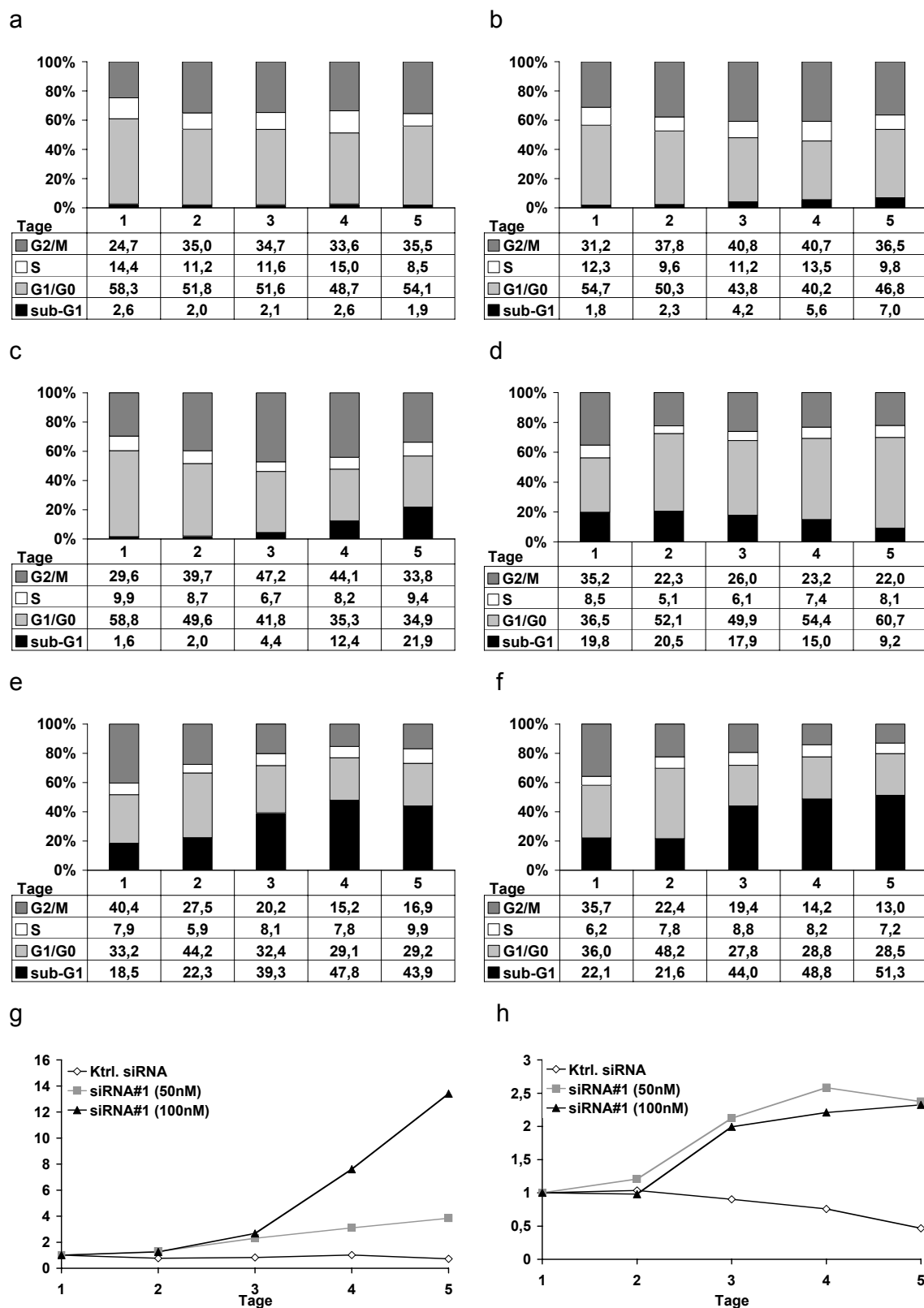


Abbildung 4.19: Quantitative Auswertung der Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS). Die PI-FACS-Kinetiken (siehe Abbildung 4.18) wurden hinsichtlich ihrer Zellzyklusverteilung ausgewertet. Aufgetragen ist die relative Zellzahl (in Prozent) für jede Zyklusphase über einen Zeitraum von fünf Tagen. GHD-Zellen (a-c): 100nM Ktrl-siRNA (a), 50nM siRNA#1 (b), 100nM siRNA#1 (c). HeLa-Zellen (d-f): 100nM Ktrl-siRNA (d), 50nM siRNA#1 (e), 100nM siRNA#1 (f).

NA#1 (f). Quantifizierung der Zellen des sub-G₁-Bereiches bei GHD (g)- und HeLa-Zellen (h). Gezeigt sind die relativen Zellzahlen; alle ermittelten Zahlen beziehen sich auf die Zellzahl an Tag eins der Transfektion.

In der Kontrollgruppe hingegen fanden sich nur 9,2% der Zellen in diesem Bereich. Durch die hnRNP H-Reduktion (100nM siRNA#1) liessen sich auch weniger Zellen im G₁/G₀-Bereich beobachten (28,5%).

Aus den oben gezeigten Beobachtungen ließ sich ein Einfluss der hnRNP H-Reduktion auf den programmierten Zelltod beobachten. Abbildung 4.19g-h zeigt eine detailliertere Auswertung dieser Zellpopulationen. Alle ermittelten Zellzahlen dieses Histogramm-Bereiches wurden nun auf die Zellzahl an Tag eins nach Transfektion bezogen. Demnach bewirkte die Repression von hnRNP H (100nM siRNA#1) in GHD-Zellen einen 13,4-fachen Anstieg in der Anzahl apoptotischer Zellen verglichen mit Zellen an Tag eins. Bei einer Konzentration von 50nM siRNA#1 wiesen 3,8-mal mehr Zellen einen apoptotischen Phänotyp auf. Die Kontrollzellen hingegen zeigten keine Erhöhung dieser Zellpopulation (0,7-fache Zellzahl). Die hnRNP H-Repression in HeLa-Zellen bewirkte eine Verdoppelung der Zellen im sub-G₁-Bereich (2,3-mal mehr Zellen an Tag fünf als an Tag eins). Interessant war, dass dies bei beiden verwendeten siRNA#1-Konzentrationen zu beobachten war. Die Kontrollzellen hingegen zeigten keine Erhöhung dieser Zellpopulation (0,46-fache Zellzahl). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Repression von hnRNP H sowohl in GHD- als auch HeLa-Zellen chromosomale DNA degradiert wird, was ein Anzeichen später Apoptose ist.

Die Ergebnisse aus der PI-FACS-Analyse sollten anschließend mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Dazu wurde eine Annexin-V-7-AAD-FACS-Analyse durchgeführt, um den Anteil apoptotischer, nekrotischer, toter sowie gesunder Zellen quantitativ zu erfassen. GHD- und HeLa-Zellen wurden zu gleichen Zellzahlen jeweils mit 100nM siRNA#1 bzw. 100nM Kontroll-siRNA transfiziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurde die Annexin-V-7-AAD-FACS-Analyse durchgeführt. Abbildung 4.20 zeigt exemplarisch ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen. Da an den Tagen eins und zwei nach Transfektion keine signifikanten Veränderungen der Zellverteilung zu beobachten waren, sind hier nur die Zellverteilungen ab Tag drei dargestellt. Abbildung 4.21 geben die quantitative Auswertung apoptotischer und nekrotischer Zellen wieder. Es zeigte sich, dass nach 5 Tagen 12,9% der GHD-Zellen nach Reduktion von hnRNP H apoptotisch sind, d.h. eine Annexin-V-Färbung aufweisen, jedoch 7-AAD-negativ sind (unterer rechter Quadrant des Histogramms). Die Zahl apoptotischer Zellen erhöhte sich ab Tag 3 nach Transfektion. Die Kontrollgruppe hingegen beinhaltete weniger als 1% Annexin-V-positive Zellen über den gesamten Messzeitraum. Der Anteil nekrotischer GHD-Zellen war weitgehend konstant. Durch die hnRNP H-

Reduktion waren ca. 5% der Zellen nekrotisch (oberer rechter Quadrant des Histogramms), in der Kontrollgruppe fanden sich weniger als 1% nekrotische Zellen.

In Abbildung 4.20b ist die quantitative Auswertung bei Behandlung von HeLa-Zellen dargestellt. Auch hier war ein hoher Anteil apoptotischer (16,12% an Tag vier) Zellen zu beobachten. Der Anteil nekrotischer Zellen betrug 3,25% an Tag vier.

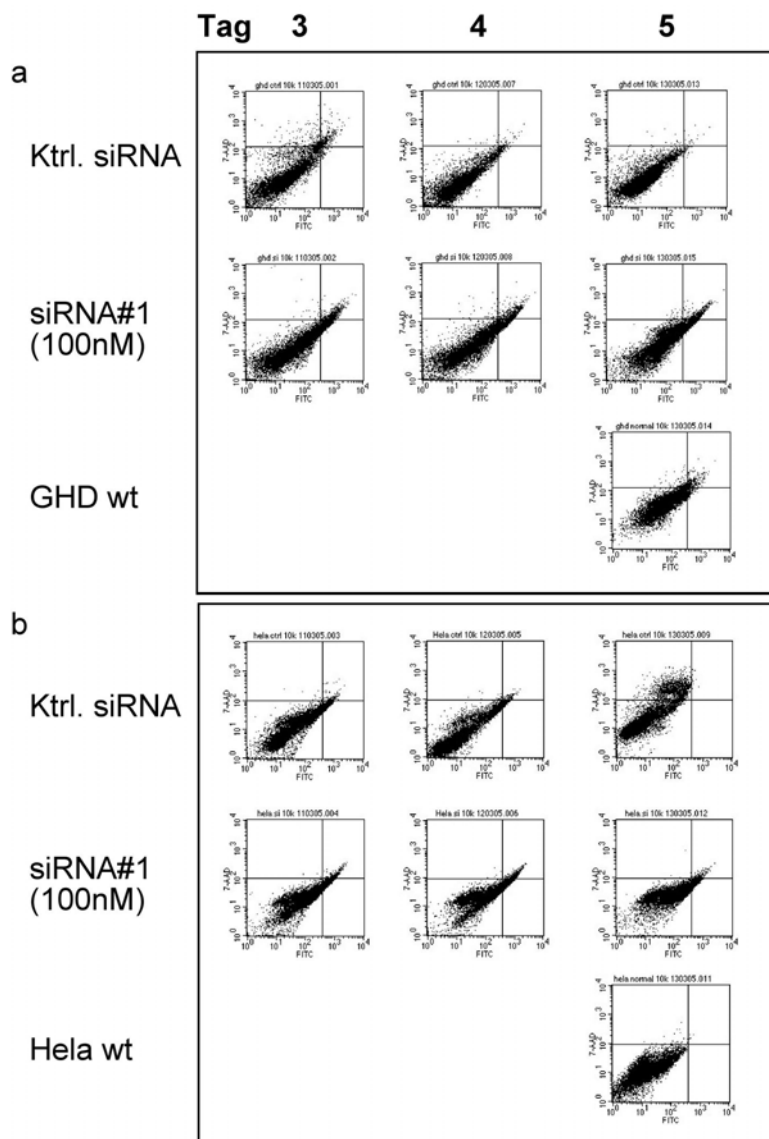


Abbildung 4.20: Quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen bei hnRNP H-Repression mittels Annexin-V-Durchflusszytometrie. GHD (a)- bzw. HeLa-Zellen (b) wurden mit 100nM Ktrl. siRNA bzw. 100nM siRNA#1 transient transfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Mittels Annexin-V-7-AAD-FACS wurde über einen Zeitraum von drei Tagen der Anteil apoptotischer Zellen erfasst. Analysiert wurden jeweils 10.000 Zellen, die Messungen werden in logarithmischen Histogrammen wiedergegeben. Annexin-V-positive Zellen sind auf der Abszisse aufgetragen, 7-AAD-positive Zellen auf der Koordinate. Die Einteilung der Quadranten erfolgte anhand der Messungen morphologisch gesunder Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen.

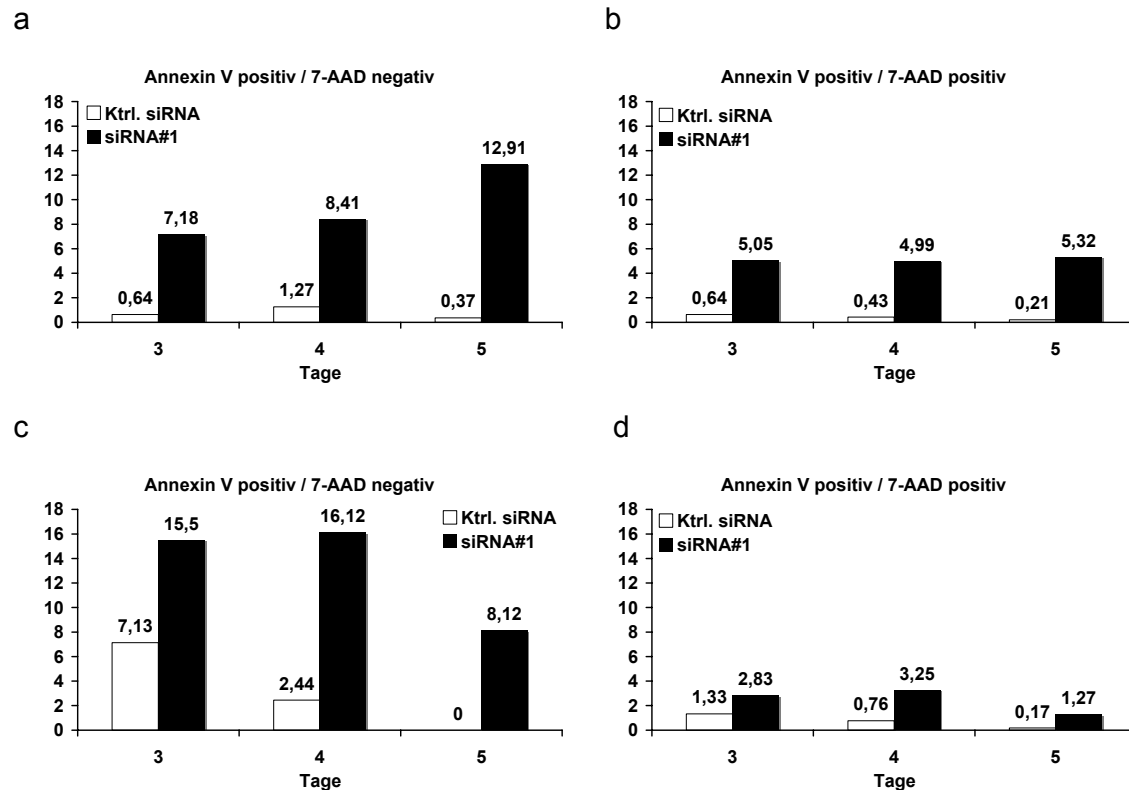


Abbildung 4.21: Quantitative Auswertung der Annexin-V-FACS-Analyse. Ausgewertet wurden die Annexin-V-7-AAD-FACS-Kinetiken (siehe Abb. 4.20). Aufgetragen ist die relative Zellzahl (in Prozent) apoptotischer (a,c) bzw. nekrotischer (b, d) Zellen in GHD-Zellen (a-b) und HeLa-Zellen (c-d).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Reduktion der hnRNP H-Menge in den Karzinomzelllinien GHD und HeLa zu einer stark erhöhten Apoptoserate führte.

4.2.4. Transkriptomanalyse der siRNA-induzierten hnRNP H-Repression

In den vorangehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass die reduzierte Expression von hnRNP H in den Karzinomzelllinien GHD und HeLa zu einer verminderten Verdoppelungszahl führt. Dieser Effekt ging einher mit einer stark erhöhten Apoptoserate. Daher erschien die Untersuchung der molekularen Grundlage für die beobachteten Effekte äußerst interessant. Hinzu kommt, dass über die molekulare Funktion des Proteins hnRNP H *bis dato* wenig bekannt ist. Die Identifizierung hnRNP H-regulierter Gene sollte dazu beitragen, die beobachteten Effekte auf molekularer Ebene zu untersuchen und möglicherweise weitere Auswirkungen von hnRNP H aufzudecken.

Zur Identifizierung hnRNP H-regulierter Gene wurde die Genexpressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Microarray gewählt, bei der die Transkriptomprofile von Zellen in Abhängigkeit der

hnRNP H-Hemmung quantitativ verglichen wurden. Diese Arrays erlauben die parallele Analyse von 29.098 Genen bzw. ca. 60.000 Transkripten. Zu diesem Zweck wurde jeweils Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen isoliert, die mit 100nM Ktrl. siRNA bzw. siRNA#1 transient transfiziert worden waren. Die Isolierung erfolgte 65h nach Transfektion, also zu einem Zeitpunkt, an dem der beobachtete Phänotyp einsetzte. Die Herstellung der Sonden mittels *in vitro*-Transkription (IVT) aus jeweils 10µg Gesamt-RNA, die Hybridisierungsreaktionen auf Human Genome Survey Microarrays (Applied Biosystems, V2.0), das Auslesen der Arrays (Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer) und die Primäranalyse erfolgte durch IMG, Martinsried. Die weitere Analyse und quantitative Auswertung der Daten wurde selbst durchgeführt. 650 Gene konnten nach Filtern der Daten bezüglich Deregulationsfaktor und Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (siehe Material und Methoden) als differenziell identifiziert werden. Abbildung 4.22 zeigt die hybridisierten Arrays als Rohdaten, in Abbildung 4.22b-d wurde die differentielle Genexpression mittels Spotfire-Software visualisiert.

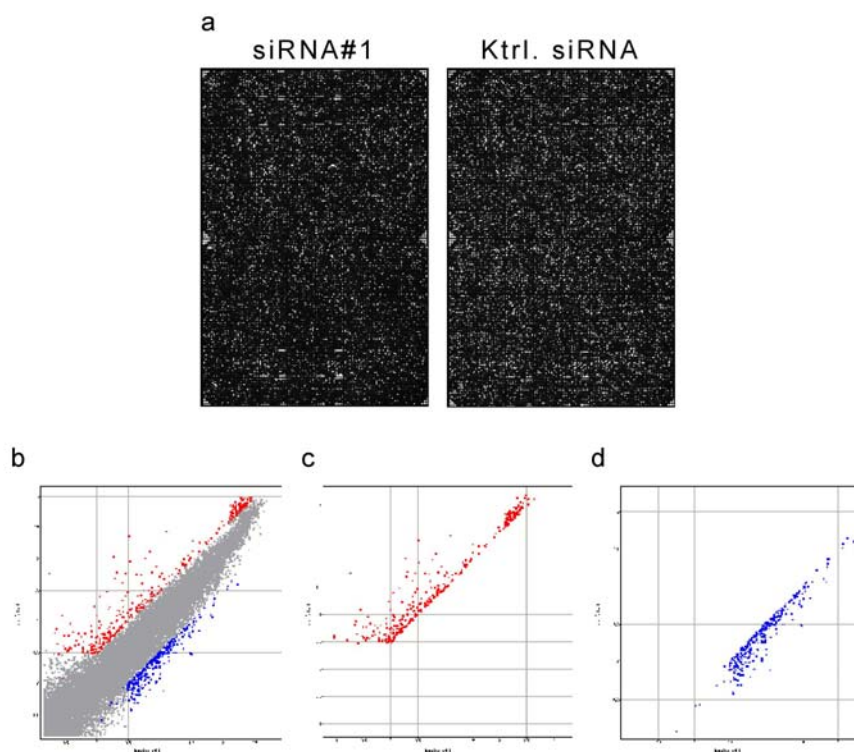


Abbildung 4.22: Genexpressionsanalyse hnRNP H-reprimierter Zellen mittels Oligonukleotid-Microarray-Analyse. Dargestellt sind die hybridisierten Microarrays (a) und Streudiagramme differentiellement regulierter Gene mittels Spotfire-Software (b-d). Gesamtdarstellung aller differentiellement regulierten Gene nach Analyse der Rohdaten (b). Durch hnRNP H-Repression induzierte Gene (c) und reprimierte Gene (d).

Es zeigte sich, dass durch die hnRNP H-Repression 358 Gene signifikant induziert (Abbildung 4.22c) und 292 Gene reprimiert wurden (Abbildung 4.22d). Bei den induzierten Genen wurden Regulationsfaktoren bis zu 324 beobachtet, bei reprimierten Genen bis zu 15. Das Gen hnRNP H wurde um den Faktor 3,2 reprimiert.

Die weitere Analyse deregulierter Gene erfolgte mit Hilfe der Panther-Software (<https://panther.appliedbiosystems.com>) mit Implementierung des Celera Discovery Systems. Die differentiell exprimierten Gene wurden dazu hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu Proteinfamilien, ihrer molekularen Funktion, des biologischen Prozesses, an dem sie beteiligt sind, oder hinsichtlich eines zugehörigen Signaltransduktionsweges klassifiziert.

Tabelle 4.5: Im Bereich Apoptose deregulierte Gene nach hnRNP H-Repression. Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels PANTHER-Software und Filterung regulierter Gene, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind. Gezeigt sind reprimierte (a) und induzierte (b) Gene. Die Sortierung erfolgte aufgrund des Deregulationsfaktors (Faktor si/Ktrl.). Angegeben sind die Datenbank-Nummer (Gene-ID), das Gen sowie der Name des Gens.

a

Nr	GEN-ID	Faktor si/Ktrl.	Gen	Gen-Name
1	hCG22327	-6,33	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1; ARHGEF1	RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 1
2	hCG33052	-6,22	BCL2-related ovarian killer; BOK	BCL-2 RELATED OVARIAN KILLER PROTEIN
3	hCG40595	-4,35	Desoxyribonuclease I-like 1; DNASE1L1	DEOXYRIBONUCLEASE I
4	hCG38811	-4,2	BCL2-like 1; BCL2L1	BCL-2 RELATED PROTEIN X
5	hCG29140	-4,1	v-raf murine sarcoma 3611 virales Onkogen Homolog1; ARAF1	A-RAF
6	hCG25301	-3,76	Scavenger receptor class B, member 1; SCARB1	SCAVENGER RECEPTOR CLASS B TYPE-1 (SR-B1)
7	hCG96740	-3,17	v-akt murine thymoma virales Onkogen Homolog 1;AKT1	RAC SERINE/THREONINE KINASE
8	hCG37855	-3,14	Death-associated protein; DAP	DAP-1
9	hCG38470	-3,03	v-myb myeloblastosis virales Onkogen Homolog (avian)-like 2;MYBL2	B-MYB

b

Nr	GEN-ID	Faktor si/Ktrl.	Gen	Gen-Name
1	hCG21114	44,61	Nicht zugeordnet	L-AMINO ACID OXIDASE - RELATED
2	hCG1749919	25,34	Lectin, Galaktosid- bindend, löslich, 9 (galec- tin 9); LGALS9	GALECTIN-5,9
3	hCG1745228	5,81	p8 protein (candidate of metastasis 1); P8	P8 PROTEIN
4	hCG21703	4,55	Growth arrest and DNA- damage-inducible, alpha; GADD45A	GROWTH ARREST AND DNA-DAMAGE- INDUCIBLE PROTEIN GADD45- RELATED
5	hCG1786240	4,29	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain; TNFRSF10C	TUMOR NECROSIS FACTOR RECEP- TOR SUPERFAMILY, MEMBER 10- RELATED
6	hCG22710	3,67	Ornithine Decarboxylase antizyme 1; OAZ1	ORNITHINE DECARBOXYLASE ANTI- ZYME 1,4
7	hCG31308	3,22	Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase); JAK2	JAK2, 3 TYROSINE PROTEIN KINASE PTK GROUP VII
8	hCG1818618	3,12	Apoptosis related protein; APR-2	APOPTOSIS-RELATED PROTEIN

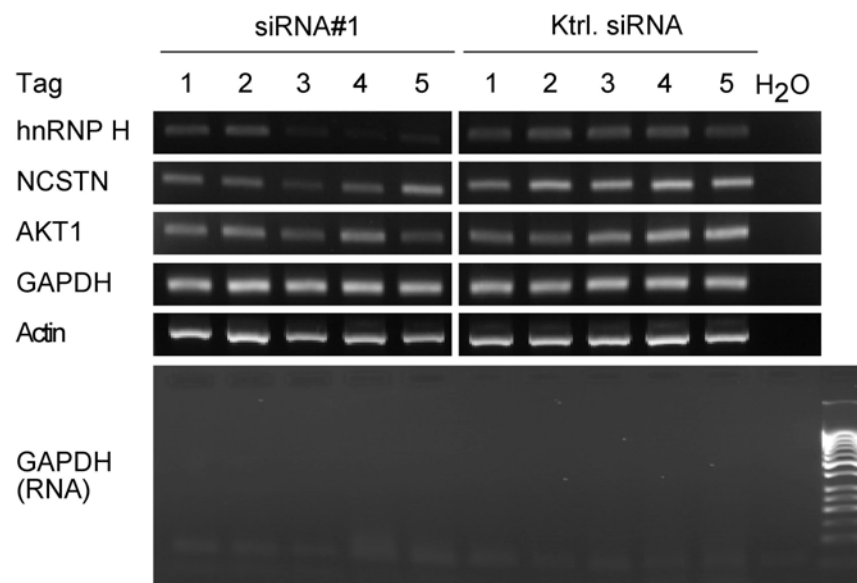
Diese Einteilung der Gene in sog. „Expressions-Cluster“ erlaubt die Analyse über- bzw. unterrepräsentierter biologischer Prozesse in den Clustern. Die Klassifizierungen der deregulierten Gene ließen jedoch keine statistisch signifikante Über- oder Unterrepresentation eines biologischen Prozesses, einer molekularen Funktion oder eines Signaltransduktionsweges erkennen. Als interessant erschien daher eine nähere Betrachtung der regulierten Gene, die an apoptotischen Prozessen in der Zelle beteiligt sind, da dieser Effekt aus oben gezeigten Analysen bekannt war. Diese Gene sind in der folgenden Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Die Klassifizierung der Gene, die an der Apoptose beteiligt sind oder im Rahmen des programmierten Zelltodes eine Rolle spielen, erfolgte über die Gruppe „*Biologischer Prozess*“, Untergruppe „*Apoptose*“. Die Klassifizierung ergab neun Gene im Bereich Apoptose, die reprimiert wurden (Tabelle 4.5a). Acht Gene wurden nach hnRNP H-Repression induziert (Tabelle 4.5b). Bei den neun reprimierten Genen fanden sich Gene wie BCL-2-related protein X (BCL-X), BCL-2-related ovarian killer (BOK) und AKT1. Diese Proteine nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Apoptose ein. Unter den acht induzierten Genen fand sich

ein Gen mit *bis dato* unbekannter Funktion, welches nach hnRNP H-Repression um den Faktor 45 induziert wurde. Des Weiteren fanden sich Gene wie GADD45A, P8 und APR-2, die ebenfalls an der Apoptose beteiligt sind. Die 17 deregulierten Gene ließen sich keinem gemeinsamen Signalweg der Apoptose zuordnen.

Die Validierung der oben gezeigten Genexpressionsanalyse erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Im Gegensatz zum Microarray sollte hier die Expression einzelner, ausgesuchter Gene über einen Zeitraum von fünf Tagen erfasst werden. Dazu wurden HeLa-Zellen transient mit siRNA#1 bzw. Ktrl. siRNA (je 100nM / 300.000 Zellen) transfiziert und die Gesamt-RNA 24h, 48h und 72h, 96h und 120h nach Transfektion isoliert.

a



b

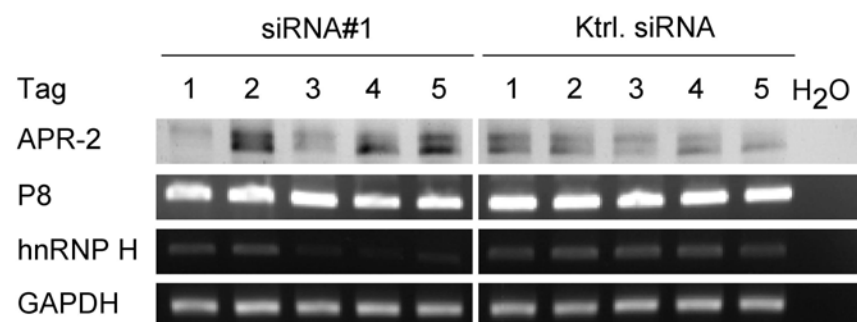


Abbildung 4.23: Relative Quantifizierung ausgewählter Gene mittels RT-PCR. siRNA#1 (100nM / 300.000 Zellen) bzw. Ktrl siRNA (100nM / 300.000 Zellen) wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert. Die Expression der Gene wurde nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt ist die Analyse ausgewählter reprimierter (a) und induzierter (b) Gene. Als Kontrollen dienen die RT-PCRs auf GAPDH und Aktin. Die Qualität der verwendeten RNA wurde mittels PCR auf GAPDH (1µg RNA) überprüft. Es zeigte sich, dass die RNA keine detektierbaren DNA-Verunreinigungen enthielt. Gezeigt sind die repräsentativen Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Expression einzelner Gene wurde mittels RT-PCR relativ quantifiziert. Abbildung 4.23 zeigt exemplarisch ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. Die Expression von hnRNP H wurde reprimiert. An Tag drei und vier war eine sehr starke Repression zu beobachten, an Tag fünf nahm die Expression wieder leicht zu. Die Expression des Gens Nicastrin (NCSTN) wurde laut Microarrayexperiment um den Faktor 14,6 reduziert. Diese Reduktion konnte mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden. An Tag drei und vier war eine Repression der NCSTN-Expression zu beobachten. Nicastrin nimmt laut Literatur eine wichtige bei der Regulation der Presenilinfunktion ein (Kopan and Goate, 2002; Yu *et al.*, 2000). Ebenso konnte die Repression von AKT1 an Tag drei nach Transfektion bestätigt werden (Faktor -3,17). Im Folgenden sollten nun zwei Gene validiert werden, deren Expression laut Arrayanalyse induziert wurde. Die Expression von Apoptosis-related protein 2 (APR-2) war am Tag drei nach Transfektion um Faktor 3,12 induziert. In der RT-PCR zeigte sich bereits am Tag zwei ein starker Anstieg der Expression, der am Tag drei wieder abnahm. Ebenso wurde das Gen P8 (candidate of metastasis) (Deregulationsfaktor +5,81) mittels RT-PCR validiert. Eine Deregulation des Gens ließ sich jedoch auf Transkriptebene nicht eindeutig nachweisen.

Wie bereits in der Einleitung der Ergebnisse erwähnt, ist laut Literatur über die Funktion von hnRNP H *in vivo* nur sehr wenig bekannt. Einige Publikationen zeigen *in vitro*, dass das Protein am Spleißen von Vorläufer-mRNAs beteiligt ist. Diskutiert wird derzeit, ob hnRNP H eine wichtige Rolle beim alternativen Spleißen von mRNAs einnimmt. Dies wurde bereits für die prä-mRNA des Gens *c-src* (Chou *et al.*, 1999) und für *beta-tropomyosin* (Chen *et al.*, 1999) gezeigt (*in vitro*). *Bis dato* sind jedoch keine Gene bekannt, deren Transkripte von hnRNP H tatsächlich *in vivo* gespleißt werden. Es stellte sich daher aufgrund der gezeigten Experimente die Frage, ob hnRNP H am alternativen Spleißen von Transkripten beteiligt ist, deren Proteinprodukte im Bereich der Apoptose eine Rolle spielen. Diese Art der Regulation ist bereits für einige Gene bekannt (Übersicht in (Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005)). Um auf diese Fragestellung einzugehen, wurden quantitative RT-PCRs etabliert, die „normal“- und alternativ gespleißte Isoformen einer mRNA analysieren. Dazu wurden die Primerbindungsstellen so gewählt, dass beide Isoformen simultan identifiziert werden konnten. Für die RT-PCRs wurden oben genannte RNAs verwendet. Abbildung 4.24 zeigt ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Auswertung des Microarrayexperimentes zeigte für das Gen Bcl-X eine 4,2-fache Repression der Expression (Tabelle 4.5). Für das Gen Bcl-X sind laut Literatur zwei Transkript-Varianten bekannt, eine längere, antiapoptotische Isoform Bcl-X_L und die kürzere, proapopto-

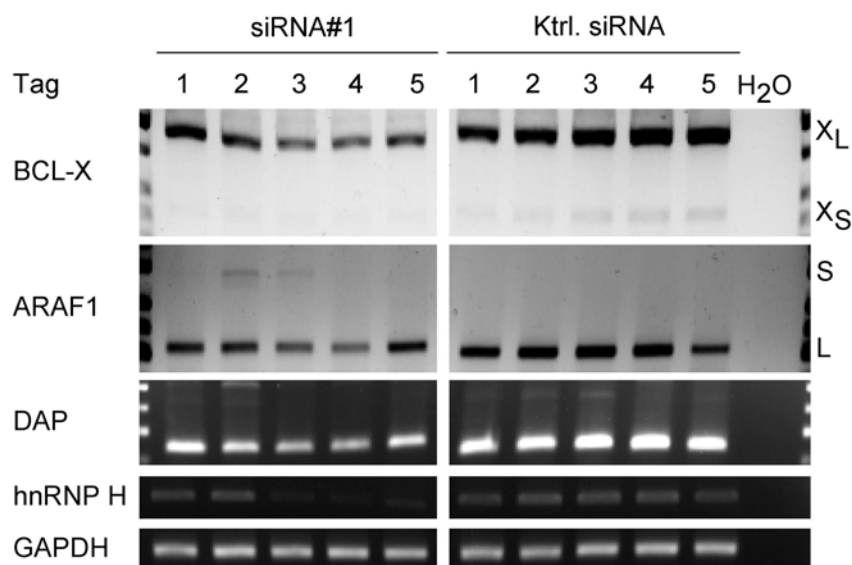
tische Isoform Bcl-X_S. Eine hohe Expression von Bcl-X_L ist u. a. mit einer verminderten Apoptoserate in Tumorzellen assoziiert (Clarke *et al.*, 1995; Olopade *et al.*, 1997). Da in Zellen beide Isoformen gleichzeitig existieren können, ist v. a. das Verhältnis beider Spleißvarianten ausschlaggebend. Wie in Abbildung 4.24 gezeigt, waren sowohl in den siRNA#1-behandelten HeLa-Zellen als auch bei den Kontrollen beide Isoformen von Bcl-X nachzuweisen. Die Bcl-X_L-Variante zeigte grundsätzlich eine höhere Expression als die kurze Form Bcl-X_S. Bei hnRNP H-reprimierten Zellen war zusätzlich eine starke Reduktion der antiapoptotischen Bcl-X_L-Isoform ab Tag zwei zu beobachten. Die Expression von Bcl-X_S war ebenfalls reprimiert. Diese Reduktion der Bcl-X_L-Expression könnte eine Ursache für den apoptotischen Phänotyp nach hnRNP H-Repression sein.

Die Expressionsänderungen beider Isoformen haben Auswirkungen auf das Verhältnis der Isoformen Bcl-X_L/Bcl-X_S. So zeigte sich eine Reduktion des Verhältnisses von Bcl-X_L zu Bcl-X_S von 6,0 auf 4,1 an Tag drei, während die Kontrollgruppe ein stabiles Verhältnis zwischen 5,6 und 5,9 aufwies (Abbildung 4.24).

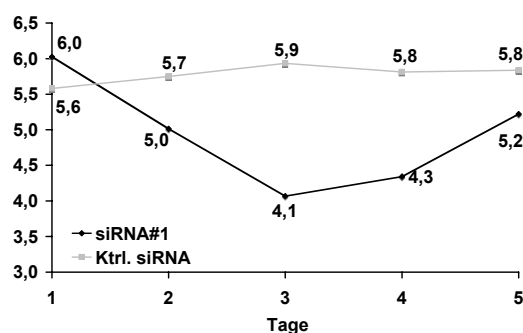
Neben Bcl-X sollte die Expression des Gens ARAF1 analysiert werden. Die ARAF1-Expression wurde laut Microarrayanalyse um den Faktor 4,1 vermindert. In der PANTHER-Datenbank (Celera Discovery System) gab es zudem Hinweise, dass es neben der normal gespleißten mRNA (hCT20300) eine kürzere Isoform gibt (hCT2257035). Laut Datenbank-eintrag werden die Introns 2 und 3 als alternative Exons 2a bzw. 3a transkribiert, wodurch es zu einer verkürzten mRNA-Isoform kommt. Zusätzlich findet sich im Intron 3 (bzw. Exon 3a) ein präterminales STOP-Codon. Es zeigte sich, dass nach hnRNP H-Reduktion die Expression der normalen mRNA bis zum Tag vier stark reduziert ist (L), während die Kontrollzellen eine unveränderte Expression zeigten. Die kürzere Isoform (S) konnte ausschließlich bei siRNA#1-behandelten Zellen am Tag zwei und drei beobachtet werden. Das Verhältnis von ARAF1-L zu ARAF1-S war bei hnRNP H-reduzierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe folglich reduziert (Abbildung 4.24).

Neben Bcl-X und ARAF1 wurde auch die Expression des Gens *death-associated protein* (DAP) analysiert. Die Expression dieses Gens zeigte sich im Microarrayexperiment um den Faktor 3,14 vermindert. In der Literatur ist *bis dato* keine alternativ gespleißte Form der mRNA beschrieben. In der Celera-Datenbank sind jedoch zwei zusätzliche Transkriptvarianten hinterlegt, bei denen ein zusätzliches Exon 1a und 2a beschrieben werden (hCG37855). Bei der Translation dieser mRNA würde sich ein grösseres Protein, bestehend aus 178 Aminosäuren, ergeben (im Vergleich zum Wildtyp-Protein: 110 Aminosäuren).

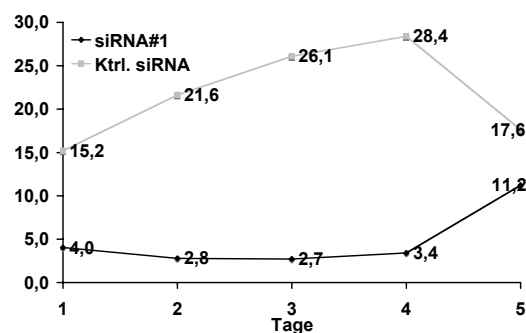
a



b



c



d

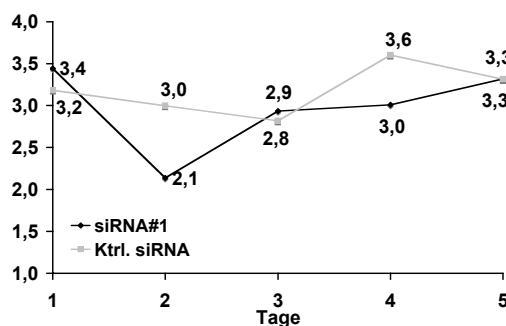


Abbildung 4.24: Quantitative RT-PCR zur Analyse alternativ gespleisster mRNAs bei Bcl-X, ARAF1 und DAP. siRNA#1 (100nM / 300.000 Zellen) bzw. Ktrl siRNA (100nM / 300.000 Zellen) wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert. Die Expression der Gene wurde nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Primerbindungsstellen wurden so gewählt, dass die zwei möglichen Isoformen der mRNA simultan identifiziert werden können. Als Kontrolle diente eine RT-PCR auf GAPDH. Die Amplikons der jeweiligen RT-PCRs wurden durch Sequenzierung bestätigt. (a). Expressionsverhältnisse der analysierten mRNA-Isoformen bei Bcl-X (b), ARAF1 (c) bzw. DAP (d). Die Auswertung der Bandenintensitäten (abzüglich der Hintergrundintensität) erfolgte mit der Software ImageJ.

Wie oben beschrieben, wurden die Primerbindungsstellen so gewählt, dass beide Isoformen DAP-S und DAP-L detektiert werden können. Wie in Abbildung 4.24 zu beobachten, zeigte sich bei hnRNP H-reprimierten Zellen eine Reduktion beider Isoformen, während in der Kontrollgruppe beide Isoformen unverändert exprimiert wurden. Das Verhältnis DAP-S / DAP-L war für beide Kinetiken konstant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Reduktion der hnRNP H-Expression mit der Reduktion der Expression der mRNAs Bcl-X, ARAF1 und DAP einhergeht. Diese Reduktion auf Transkriptebeine soll auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt werden und ist Gegenstand eines laufenden Projektes.

4.2.5. ARAF1 interagiert mit MST2 und inhibiert dessen Kinaseaktivität

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, geht die Reduktion der hnRNP H-Expression in Tumorzelllinien mit einem apoptotischen Phänotyp einher. Die Betrachtung möglicher Substrate von hnRNP H auf Transkriptebeine zeigte die Deregulation von Genen, die im Rahmen des programmierten Zelltodes Schlüsselrollen einnehmen. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass die Expression des Gens ARAF1 nach hnRNP H-Reprimierung verringert wurde. Es stellte sich die Frage, in welcher Art und Weise ARAF1 zur Apoptose in Tumorzelllinien führen kann. *Bis dato* gibt es laut Literatur keinen Hinweis darauf, dass eine verringerte ARAF1-Expression zum programmierten Zelltod führt. ARAF1 gehört neben B-Raf und Raf1 zur Familie der Raf-Proteinkinasen. Alle drei Proteine sind Serin-Threonin-Kinasen, die eine zentrale Rolle im *Mitogen-activated protein kinase* Signaltransduktionsweg (MAPK pathway) einnehmen. Neben dieser Funktion wurde für das Proto-Onkogen Raf1 gezeigt, dass es die proapoptotische Kinase Mammalian Sterile20-like kinase (MST2) reguliert. Eine Reduktion der RAF1-Expression induziert Apoptose (O'Neill *et al.*, 2004; O'Neill *et al.*, 2005).

Es stellte sich die Frage, ob ARAF1 eine redundante Funktion von RAF1 einnimmt. Für diese Funktion ist eine direkte Interaktion von ARAF1 mit MST2 sowie die Inhibierung der Kinaseaktivität von MST2 durch ARAF1 notwendig. Zum Nachweis der Interaktion wurden HEK-293 Zellen mit zwei Expressionsplasmiden transient transfiziert, die jeweils für die gesamte cDNA von ARAF1 bzw. MST2 kodieren. ARAF1 wurde N-terminal mit einer myc-Sequenz fusioniert (myc-TAG), MST2 mit einer Flag-Sequenz (Flag-TAG). Die transfizierten Zellen wurden lysiert und Ko-Immunopräzipitationen (Ko-IP) wurden mittels immobilisierter, spezifischer Antikörper gegen die Fusionsproteine (myc, Flag) wechselseitig durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Immunoblotexperimenten mit spezifischen Antikörpern gegen den myc-

Tag bzw. den Flag-Tag. Abbildung 4.25a zeigt exemplarisch ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen. Bei paralleler Transfektion beider Konstrukte konnte nach Ko-IP von Flag-MST2 die Interaktion mit myc-ARAF1 mittels Westernblot gezeigt werden (3. Bande von links, unten). Umgekehrt konnte auch Flag-fusioniertes MST2 mittels myc-ARAF1 präzipitiert und detektiert werden (1. Bande von rechts, oben).

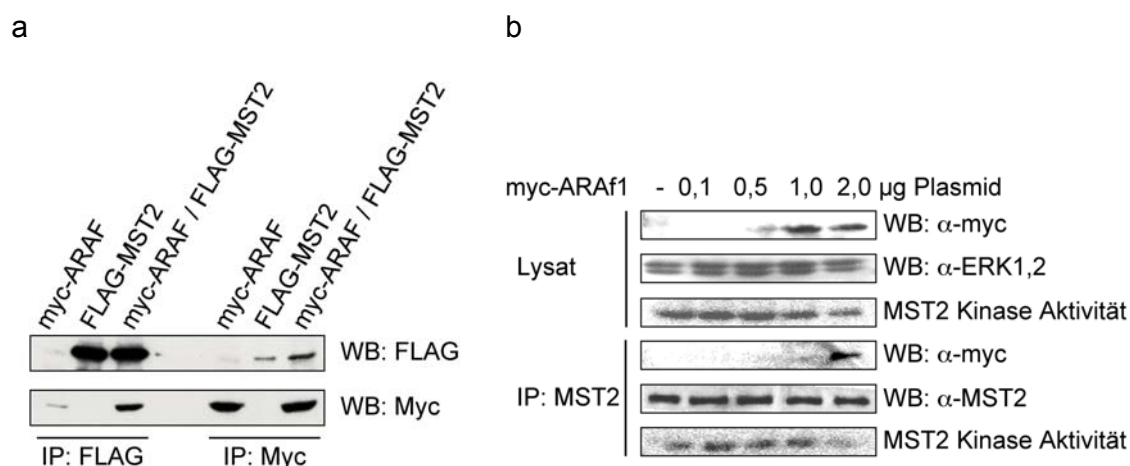


Abbildung 4.25: ARAF1 interagiert mit MST2 und reduziert dessen Kinase-Aktivität. HEK-293 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden myc-ARAF1, FLAG-MST2 bzw. beiden Plasmiden parallel transient transfiziert (à 1µg). Die transfizierten Zellen wurden lysiert und Ko-Immunopräzipitationen (Ko-IP) mittels immobilisierter, spezifischer Antikörper gegen die Fusionsproteine (myc, Flag) wechselseitig durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen den myc-Tag bzw. den Flag-Tag in Westernblotexperimenten. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Versuchen (a). HEK-293 Zellen wurden mit 0, 0,1, 0,5, 1,0 bzw. 2,0µg des Expressionsplasmids myc-ARAF1 transient transfiziert. Nach Lysierung der Zellen erfolgte die Detektion der ARAF1-Expression mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot. Als Ladekontrolle erfolgte der Westernblot auf die Kinasen ERK1 und ERK2 mittels spezifischem Antikörpers. Die Kinaseaktivität von endogenem MST2 wurde mittels In-Gel-Kinase-Analyse semiquantitativ bestimmt. Die IP von endogenem MST2 erfolgte mit einem immobilisierten, spezifischen Antikörper gegen MST2. Die Detektion der Ko-IP von ARAF1 und MST2 erfolgte im Westernblot mit spezifischem Antikörper gegen myc-ARAF1. Die Kinaseaktivität von immunpräzipitiertem endogenem MST2 erfolgte mit Hilfe der Kinaseaktivitäts-Analyse. Als Ladekontrolle erfolgte der Westernblot auf endogenes MST2. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Versuchen (b).

Neben der Interaktion der beiden Proteine wurde auch die Fähigkeit von ARAF1 untersucht, die Kinase-Aktivität von MST2 zu inhibieren. Diese Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation von Eric O'Neill (The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow) durchgeführt. Dazu wurden HEK-293 Zellen mit einer ansteigenden Konzentration des Expressionsplasmids transient transfiziert, welches myc-Tag-fusioniertes ARAF1 exprimiert. Nach Lyse der transfizierten Zellen erfolgte die Detektion des Proteins mittels spezifischer Antikörper im Western Blot. Abbildung 4.25b zeigt exemplarisch ein repräsentatives Experiment

aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Detektion von transfiziertem myc-ARAF1 erfolgte ab einer Konzentration von 0,5µg Plasmid. Als Ladekontrolle erfolgte der Westernblot auf die Kinasen ERK1 und ERK2. Die Transfektion von ARAF1 in HEK-293-Zellen geht mit einer Reduktion der Kinaseaktivität einher. Nach IP von endogenem MST2 mit einem immobilisierten, spezifischen Antikörper konnte die Interaktion von MST2 mit ARAF1 verifiziert werden. Desweiteren konnte mittels Kinaseaktivitäts-Analyse eine Reduktion der Kinaseaktivität von MST2 durch steigende ARAF1-Konzentrationen gezeigt werden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass ARAF1 mit der proapoptotischen Kinase MST2 interagiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ARAF1 die Kinaseaktivität von MST2 inhibiert. Detailliertere Untersuchungen zur Fragestellung, ob ARAF1 eine redundante Funktion von RAF1 einnimmt, ist Gegenstand eines laufenden Projektes.

4.2.6. Proteomanalyse der siRNA-induzierten hnRNP H-Repression

Wie oben beschrieben wurden die Auswirkungen der hnRNP H-Reduktion auf Transkriptebene mittels Microarray analysiert. Diese Art der Analyse hat jedoch technisch bedingte Einschränkungen. Transkripte können nur dann quantitativ erfasst werden, wenn hierfür auf dem Microarray eine Messung vorgesehen ist. Bei dem verwendeten Array kann zwischen verschiedenen Isoformen einer mRNA nicht unterschieden werden.

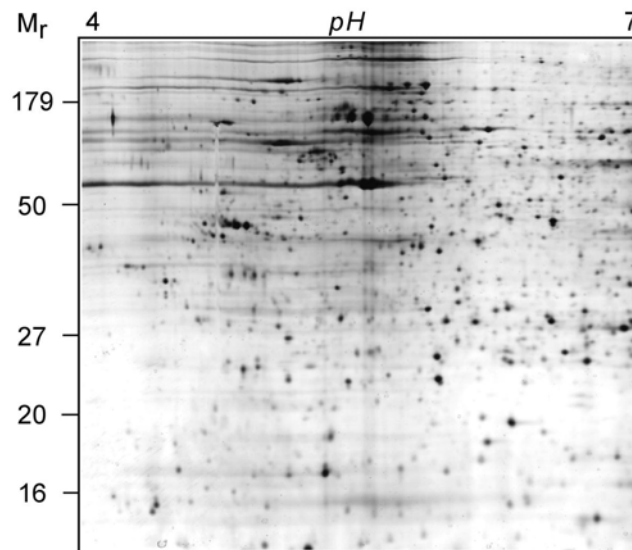


Abbildung 4.26: 2D-PAGE Auftrennung eines Protein-Gesamtlysates nach hnRNP H-Reduktion. HeLa-Zellen wurden transient mit 100nM siRNA#1 oder 100nM Ktrl. siRNA transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen (2×10^6) in 2D-Lysispuffer lysiert. Die Gesamtlysate wurden mittels zweidimensionaler Elektrophorese (2D-PAGE) separiert: IEF:pH 4-7, 90kVh; 2.Dim. 11% SDS-PAGE. Gezeigt ist ein repräsentatives 2D-Gel mit Gesamtlysat nach hnRNP H-Repression.

Auf Proteinebene sollten sich solche Veränderungen detektieren lassen. Für diese Proteomanalyse wurde das gleiche zelluläre System wie bei der durchgeführten Transkriptomanalyse gewählt: HeLa-Zellen wurden transient mit 100nM siRNA#1 oder 100nM Ktrl. siRNA transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen in 2D-Lysispuffer aufgenommen. Die Gesamtlysate wurden mittels zweidimensionaler Elektrophorese (2D-PAGE) separiert. Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. Ein repräsentatives zweidimensionales Gel ist in Abbildung 4.26 gezeigt. Die fortführende Analyse und Identifizierung differenzieller Proteine mittels Massenspektrometrie konnte aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden und ist Gegenstand eines laufenden Projektes.

4.3. Untersuchungen zur posttranslationalen Modifikation von hnRNP H

Neben den in Kapitel 4.2 durchgeführten funktionellen Analysen des Proteins hnRNP H erschien eine Untersuchung der post-translationalen Modifikation des Proteins als interessant. In der Literatur sind *bis dato* sehr wenige Informationen zu Modifizierungen des Proteins bekannt. Navakauskiene und Kollegen berichten, dass hnRNP H während der Apoptose an Tyrosinen phosphoryliert wird. Details sind jedoch nicht bekannt (Navakauskiene *et al.*, 2004). Honoré und Kollegen zeigten, dass hnRNP H wahrscheinlich proteolytisch gespalten wird (Honoré *et al.*, 1999). Es wird diskutiert, dass die entstehenden Spaltprodukte oder Untereinheiten eigene Aktivitäten hinsichtlich RNA-Bindung besitzen könnten und somit für spezifische Reaktionen geeignet sein. Direkte Beweise für das Auftreten der hnRNP H-Untereinheiten liegen *bis dato* nicht vor. Dieses Kapitel soll daher auf die Frage eingehen, ob die beschriebenen Spaltprodukte von hnRNP H tatsächlich in zellulären Systemen zu finden sind.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 kurz beschrieben, wurden nach Identifizierung der potenziellen TAs mittels Massenspektrometrie die experimentell ermittelten Molekulargewichte sowie deren isoelektrische Punkte mit den theoretisch berechneten verglichen. Bei dem Protein hnRNP H fiel auf, dass theoretische und experimentelle Werte nicht übereinstimmten. Abbildung 4.27 zeigt repräsentativ eines der zwei 2D-Gele, aus denen hnRNP H identifiziert wurde (siehe Pfeil). Demnach handelt es sich um ein ca. 23kDa grosses Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 6,5-7. Theoretisch ist hnRNP H jedoch 49,2kDa groß, der berechnete pI liegt bei 5,89. Bei Betrachtung der massenspektrometrischen Daten fiel auf, dass alle 10 identifizierten Peptide des tryptischen Verdaus aus der N-terminalen Hälfte des Gesamtproteins stammen (Abbildung 4.27b). Das theoretisch berechnete Molekulargewicht dieser Aminosäu-

ren (Aminosäure 1 bis 200) beträgt 22,7kDa, der pI liegt bei 6,54. Es ist also wahrscheinlich, dass der identifizierte Proteinspot nur die N-terminalen Aminosäuren von 1 bis ca. 200 enthielt. Diese Identifizierung wäre eine Bestätigung der Ergebnisse von (Honore *et al.*, 1999), wo solche Bruchstücke des Proteins beobachtet worden sind. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse, würde das N-terminale Spaltprodukt die beiden RNA-Bindungsdomänen qRRM1 und qRRM2 sowie einen Teil der ersten „Hilfsdomäne“ AUX1 umfassen (Abbildung 4.27c). Der zweite C-terminale Teil des Proteins würde somit die RNA-Bindungsdomäne qRRM3 und die zweite Hilfsdomäne AUX2 umfassen.

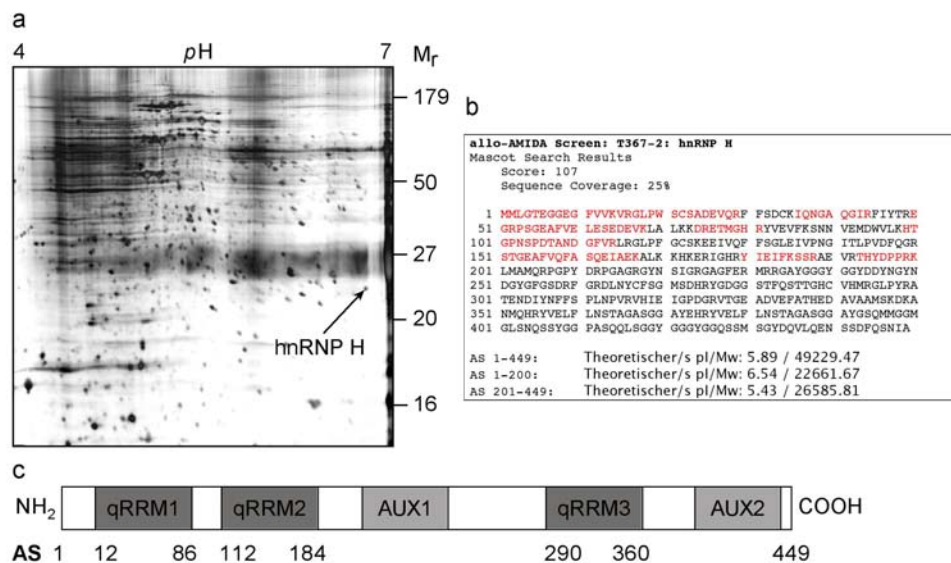


Abbildung 4.27: Identifizierung von hnRNP H mittels allo-AMIDA. Gezeigt ist ein repräsentatives 2D-Gel einer Immunpräzipitation, aus welchem hnRNP H isoliert wurde (a). Sequenzüberlagerung analysierter Peptide (rot) mit dem Gesamtprotein (schwarz) der massenspektrometrischen Analyse. Gezeigt sind berechnete theoretische Molekulargewichte und isoelektrische Punkte des Gesamtproteins und Spaltprodukte davon (b). Schematischer Aufbau von hnRNP H und Darstellung der Domänenstruktur des Proteins nach (Honore *et al.*, 1999). AS: Aminosäurerest, qRRM: quasi-RNA-Bindungsdomäne, AUX: Hilfsdomäne.

Im folgenden sollten die oben gemachten Beobachtungen bestätigt und detaillierter analysiert werden. Dazu wurden Zellen der Zelllinie GHD mit einem Expressionsplasmid, welches für die gesamte cDNA von hnRNP H kodiert, stabil transfiziert. N- bzw. C-terminal an hnRNP H wurde ein sog. HA-tag fusioniert, der die Detektion von hnRNP H bzw. dessen Spaltprodukte im Immunoblot ermöglicht (GHD hnRNP H N-HA bzw. GHD hnRNP H C-HA). Als Kontrolle wurde der entsprechende Leervektor des Expressionsplasmids stabil transfiziert (GHD pcDNA3.1 leer). Die Expression der beiden hnRNP H-Fusionsproteine konnte in Immunoblot Experimenten mit einem spezifischen Antikörper gegen den HA-Tag (3F10) nachgewiesen werden. Abbildung 4.28 zeigt ein repräsentatives Experiment. Beim ungespaltenen Fusions-

protein war jeweils als Bande von ca. 49kDa Grösse detektierbar (Bande 1). Beim N-terminalen Fusionsprotein (GHD hnRNP H N-HA) konnten drei zusätzliche putative Spaltprodukte detektiert werden. Diese haben geschätzte Molekulargewichte von 37 kDa (Bande 2), 25kDa und 23kDa (Banden 3). Ein Spaltprodukt dieser Grösse entspricht dem im AMIDA-Screen detektierten N-terminalen Teil von hnRNP H. Bei C-terminaler Fusion konnten fünf zusätzliche Spaltprodukte zwischen 37 bis 20kDa beobachtet werden. Interessanterweise traten diese Banden (Banden 1-6) reproduzierbar als Doppelbanden auf. Bei Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren, wurden erwartungsgemäss keine Banden detektiert. Aus der hohen Zahl der potenziellen Spaltprodukte konnte keine direkte Berechnung einer oder mehrerer Spaltstellen erfolgen. Die detektierten Banden und deren geschätzte Molekulargewichte sind in Tabelle 4.6a zusammengefasst.

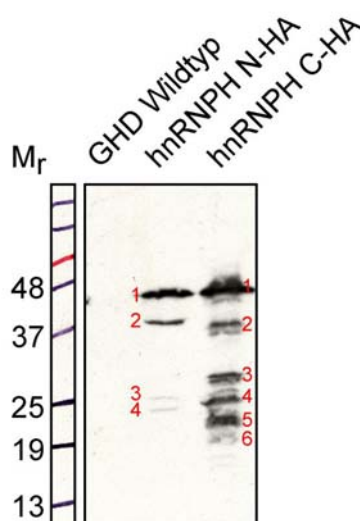


Abbildung 4.28: Expression von HA-fusioniertem hnRNP H in stabil transfizierten GHD-Zellen. GHD-Zellen wurden stabil mit einem hnRNP H-kodierenden Expressionsvektor transfiziert. hnRNP H wurde N- bzw. C-terminal mit einem HA-Tag fusioniert (GHD hnRNP H N-HA bzw. GHD hnRNP H C-HA). Als Kontrolle wurden GHD Zellen mit dem korrespondierenden Leervektor stabil transfiziert (GHD pcDNA3.1 leer). Die Expression der Fusionsproteine wurde im eindimensionalen (1D) Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (3F10) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts in kDa wurde ein Marker (M_r) mitgeführt.

Im Folgenden sollten zweidimensionale (2D) Western Blots durchgeführt werden. Neben dem Molekulargewicht eines detektierten Spots kann somit auch der isoelektrische Punkt analysiert werden. Dazu wurden die stabilen Transfektanten GHD hnRNP H N-HA und GHD hnRNP H C-HA in 2D-Lysispuffer lysiert. Als Kontrolle dienten Lysate der Zelllinie GHD pcDNA3.1 leer. Die Proteinlysate wurden anschließend zweidimensional separiert, wobei die erste Dimension aus einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) über einen immobilisierten pH-Gradienten (pH 3-10) bestand. Nach dieser Separierung der Proteine bezüglich ihres jeweili-

gen isoelektrischen Punktes (pI) erfolgte die zweite Dimension mittels einer vertikalen SDS-Polyacryamidgelelektrophorese. Die Auftrennung der Proteine erfolgte hier bezüglich des Molekulargewichtes.

Die Visualisierung der beiden hnRNP H-Fusionsproteine bzw. der potenziellen Spaltprodukte erfolgte in Immunoblot Experimenten mit einem spezifischen Antikörper gegen den HA-Tag (3F10). Abbildung 4.29 zeigt ein repräsentatives Experiment.

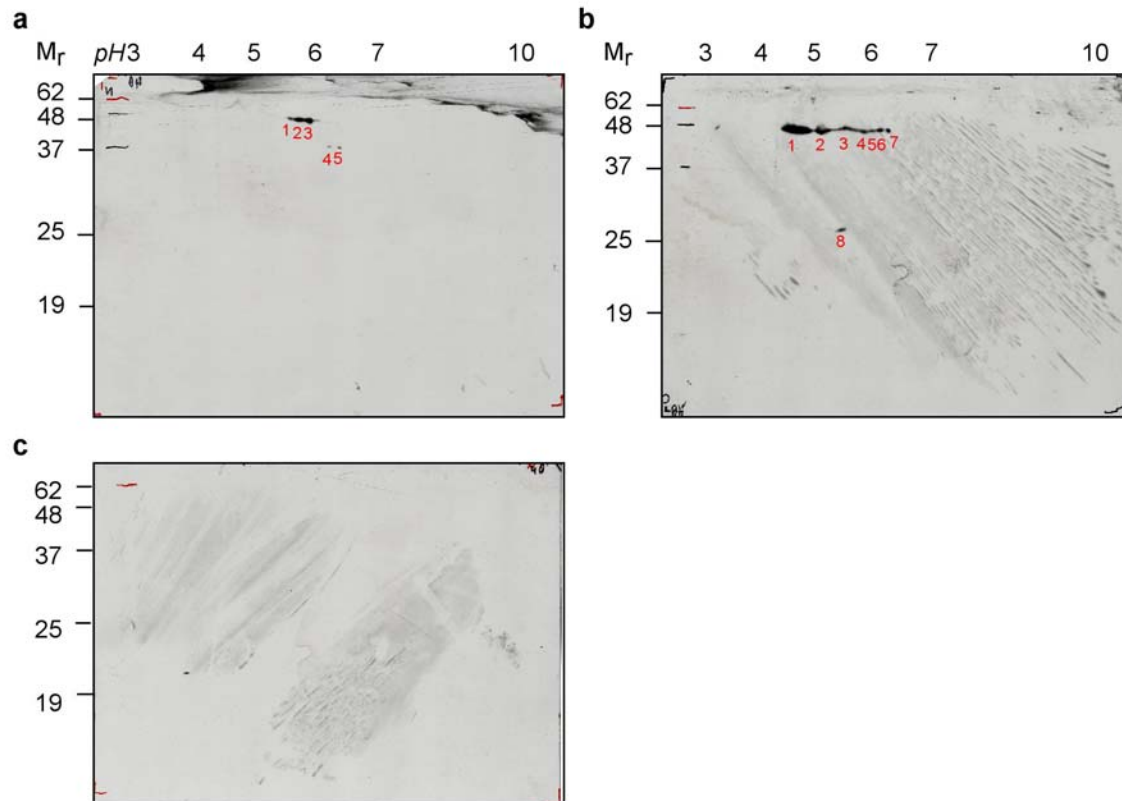


Abbildung 4.29: Zweidimensionale Immunoblots zur Detektion potenzieller hnRNP H-Spaltprodukte. GHD-Zellen wurden stabil mit einem hnRNP H-kodierenden Expressionsvektor transfiziert. hnRNP H wurde N-terminal (a) bzw. C-terminal (b) mit einem HA-Tag fusioniert (GHD hnRNP H N-HA bzw. GHD hnRNP H C-HA). Als Kontrolle wurden GHD Zellen mit dem korrespondierenden Leervektor stabil transfiziert (GHD pcDNA3.1 leer) (c). Gesamtllysate der stabilen Transfektanten wurden zweidimensional separiert (IEF: pH 3-10. 2. Dimension: 12% SDS-PAGE). Die Expression der Fusionsproteine wurde im zweidimensionalen (2D) Western Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (3F10) in Kombination mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts in kDa wurde ein Marker (Mr) mitgeführt.

Bei stabiler Transfektion mit dem N-terminalen Fusionsprotein waren fünf Spots zu beobachten. Die Spots 1 bis 3 haben ein geschätztes Molekulargewicht von 49kDa, der pI liegt zwischen 5,5 und 6,0. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das ungespaltene Protein hnRNP H (Theoretisch berechnete Werte: 49,2kDa, pI 5,89), welches posttranslato-

nale Modifikationen aufweist. Möglich wäre eine Modifikation des Proteins durch ein oder mehrere Phosphorylierungen, bei dem der pI des Proteins vermindert wird. Desweiteren finden sich 2 Spots (4-5) mit 37kDa und einem pI zwischen 6,0 und 6,5. Bei C-terminaler Fusion des HA-tags fanden sich acht Spots. Sieben wiesen ein geschätztes Molekulargewicht von 49kDa auf, der pI lag zwischen 4,5 und 6,5. Auch hier wäre eine Modifikation durch Phosphorylierungen eine wahrscheinliche Ursache. Als mögliches Spaltprodukt war ein Spot mit 25kDa zu beobachten, der pI lag bei 5,0 bis 5,5.

Tabelle 4.6: Potenzielle Spaltprodukte der hnRNP H-HA-Fusionsproteine. Zusammenge stellt sind die geschätzten Größen der Produkte in kDa bei eindimensionalem Western Blot (a). Beim zweidimensionalen Western Blot (b) ist das geschätzte Molekulargewicht (in kDa) und der geschätzte isoelektrische Punkt (pI) angegeben.

a

Zellen	#	MW (kD)	pI	Bemerkungen
GHD wt	-	-	-	
hnRNPH	1	49		
N-HA	2	37		
	3-4	25		
hnRNPH	1	49		Doppelbande
C-HA	2	37		Doppelbande
	3	29		Doppelbande
	4	25		Doppelbande
	5	22		Doppelbande
	6	20		Doppelbande

b

Zellen	#	MW (kD)	pI	Bemerkungen
GHD wt	-	-	-	
hnRNPH	1-3	49	5,5-6,0	
N-HA	4-5	37	6,0-6,5	
hnRNPH	1-7	49	4,5-6,5	
C-HA	8	25	5,0-5,5	

Die Auswertung der 1D- und 2D-Western Blots ermöglichte keine Berechnung von möglichen Spaltstellen im Protein hnRNP H. Neben der postulierten Spaltstelle gibt es offensicht-

lich weitere Spaltstellen innerhalb des Proteins. Hinzu kommen andere mögliche Modifikationen wie Phosphorylierungen, die die Auswertung erschweren.

Eine anschließende Frage wäre, ob potenzielle Spaltprodukte von hnRNP H unterschiedliche Lokalisationen innerhalb des Zellkerns einnehmen. Diese Fragestellung könnte mittels immunhistochemischer Experimente mit einem spezifischen Antikörper gegen die HA-Fusionsproteine beantwortet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Fusionierung fluoreszierender Proteine wie das Green Fluorescent Protein (GFP) anstelle der verwendeten HA-Fusionen.

Die detailliertere Analyse post-translationaler Modifikationen von hnRNP H sowie die Lokalisation potenzieller Spaltprodukte von hnRNP H ist Gegenstand eines laufenden Projektes.

5. Diskusssion

5.1. Weiterentwicklung der AMIDA-Technologie zur allo-AMIDA-Technologie

Maligne Erkrankungen werden Schätzungen zufolge in den nächsten Jahren die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern sein. Die wichtigsten Voraussetzungen zur Bekämpfung von Krebsleiden sind zuverlässige Vorsorgeuntersuchungen insbesondere bei Risikogruppen, um eine optimale Früherkennung zu gewährleisten. Für diese Untersuchungen stehen *bis dato* nur für wenige Tumorentitäten valide Biomarker zur Verfügung, wie beispielsweise PSA zur Frühdiagnose des Prostatakarzinoms. Für die klinische Anwendung werden daher seit einigen Jahren gezielt Techniken zur Identifizierung neuer Biomarker entwickelt. Hervorzuheben sind hier serologische Verfahren wie SEREX (Chen *et al.*, 1997) und PROTEOMEX (Klade *et al.*, 2001). Beide Techniken basieren auf einer spezifischen humoralen Antwort gegen Tumorantigene bzw. Tumor-assoziierte Antigene und wurden für eine Vielzahl von Tumorentitäten durchgeführt (Le Naour, 2001).

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine neue Strategie zur Identifizierung von Tumorantigenen etabliert. Diese Technik wurde AMIDA genannt, ein Akronym für die „Antibody-mediated Identification of Antigens“ (Gires *et al.*, 2004). AMIDA basiert auf der spezifischen Autoantikörper-vermittelten Selektion und Aufreinigung potenzieller Tumorantigene und deren anschließender zweidimensionaler Auftrennung und Isolierung. Die Technik besitzt einige Vorteile gegenüber den angesprochenen Techniken SEREX und PROTEOMEX. So lassen sich aufgrund der Verwendung von rekombinanten Proteinen bei SEREX keine Proteine mit post-translationalen Modifikationen identifizieren. Dies ist bei PROTEOMEX und AMIDA möglich. Die Durchführung von SEREX ist zudem sehr langwierig und technisch schwierig, weil zunächst cDNA-Banken aus Tumorproben generiert und in Phagen-Vektoren kloniert werden müssen. Bei PROTEOMEX erfolgt die Erkennung der Tumorantigene nach der Auftrennung der komplexen Proteingemische mittels 2D-Elektrophorese. Da die klassische 2D-Gelelektrophorese jedoch nur eine begrenzte Anzahl der abundantesten Proteine (maximal ca. 3000) aufzutrennen vermag, können hierbei nur Antigene aus dieser limitierten Proteinzahl untersucht werden. Schätzungen gehen davon aus, dass es insgesamt ca. 300.000 unterschiedliche Proteinspezies gibt, in differenzierten Zellen ca. 30.000 Spezies. Mittels klassischer 2D-Elektrophorese können also maximal zwischen 1% und 10% des Gesamtproteoms pro Gel aufgetrennt werden. Ein weiteres technisches Problem ist der Vergleich von Silber-Gelen und 2D-Immunoblots, da die Gefahr besteht, falsche Proteine durch den Vergleich der

Spotmuster zu isolieren. Unter einem Silber-gefärbten Spot können mehrere Proteine liegen, so dass nicht eindeutig ist, welches von ihnen vom Antikörper erkannt wird.

AMIDA überkommt einige dieser Limitationen von SEREX und PROTEOMEX. So findet eine Selektion der Antigene vor der 2D-Elektrophorese mittels Immunopräzipitation statt. Dies resultiert in einer drastischen und gut reproduzierbaren Reduktion der Komplexität des aufzutrennenden Proteingemisches.

Des weiteren zeigte sich, dass die autolog durchgeführte AMIDA-Technik einige Limitationen und Nachteile birgt. Dies betrifft etwa die verwendete Proteinquelle. Beim Standard-Protokoll der autologen AMIDA-Version werden Proteinlysate aus Primärtumoren verwendet. Biopsien aus chirurgischen Eingriffen in Kombination mit autologem Serum des Patienten sind jedoch nur begrenzt verfügbar. Daher ist eine beliebige Reproduzierbarkeit der Experimente nicht gegeben. Hinzu kommt, dass Tumorgewebe sehr heterogen aufgebaut sind und dementsprechend unterschiedliche Mengen nicht-maligner infiltrierender Zellen enthalten. Die meiner Meinung nach größte Limitation der autologen AMIDA Methode betrifft die eingesetzten Kontrollen. Die Verwendung von gesundem Gewebebiopsien aus dem Hals-Rachen-Raum ist ethisch nicht vertretbar. Daher werden neben der eigentlichen IP von Tumorzelllysate mit autologen Serumantikörpern beim Originalprotokoll zwei nur bedingt geeignete Kontrollen durchgeführt: (1) die IP von Serumantikörpern mit Lysaten aus autologen Leukozyten und (2) die IP „ohne Tumorzelllysate“. Es war ein Ziel dieser Arbeit, diese technischen Limitationen von AMIDA zu umgehen und die Technik weiter zu optimieren. Diese Änderungen sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Anstelle von Tumorzelllysaten aus Primärtumoren werden Lysate aus Tumorzelllinien verwendet. Diese stellen eine nahezu unbegrenzte und homogene Proteinquelle dar. Auf diese Weise können Patienten-Seren unter standardisierten Bedingungen analysiert und beliebig reproduziert werden. Diese Änderung des Protokolls hat zur Folge, dass die Technik nicht mehr autolog sondern allogenen durchgeführt wird. Aus diesem Grund kann auch die IP von Tumorzelllysate mit Antikörpern gesunder Spender allogenen durchgeführt werden. Um individuelle Serumreaktivitäten einzelner Spender auszuschließen, wurden Gemische aus 100 Seren gesunder Spender verwendet. Bei der Verwendung von Zelllinienlysaten in Kombination mit einem Tumors Serum und einem Normalserum sind somit nur noch zwei anstelle von drei 2D-Gelen notwendig. Aufgrund des nunmehr allogenen Charakters der Technik wurde die weiterentwickelte Technik als „allo-AMIDA“ bezeichnet.

Neben diesen Änderungen wurde allo-AMIDA im präparativen Maßstab durchgeführt, um so die Sensitivität zu erhöhen. Dazu wurden die jeweiligen Mengen an Antikörpern, Sepharose-

Beads und eingesetztem Zellysatz erhöht (siehe Tabelle 5.1). Um eine effizientere Kopplung der Antikörper an die Sepharose mittels Crosslink zu gewährleisten und eine Verunreinigung mit Serumbestandteilen auszuschließen, wurden die IgGs vor der Kopplung aus dem Serum aufgereinigt. An Stelle der bisher benutzten Protein A-Sepharose wurde Protein G-Sepharose verwendet, um theoretisch alle vier humanen IgG-Subklassen binden zu können (Nach Angaben des Herstellers bindet Protein A keine humanen IgG₃-Antikörper.).

Diese technischen Veränderungen resultierten in einer größeren Menge an aufzutrennenden Proteinen. Um die Separierung der Immunpräzipitate im Rahmen der 2D-Elektrophorese gewährleisten zu können, wurde die Auftrennungsfläche vergrößert (von 324cm² auf 480cm² theoretische Fläche).

Tabelle 5.1: Vergleich von AMIDA und allo-AMIDA.

	AMIDA-Protokoll	allo-AMIDA-Protokoll	Grund der Änderung
Antikörper und IP	Direkte Kopplung von Antikörpern aus 300µl Serum.	Aufreinigung der Antikörper vor der Kopplung. 10mg werden gekoppelt.	Quantitative Kopplung von IgGs an die Sepharose. Depletion abundanter Serumproteine (Albumin).
	Protein A Sepharose (100µl)	Protein G Sepharose (500µl)	Bindung aller humanen IgG-Subklassen.
	-	IgG-Pool von 100 gesunden Spendern	Kontrolle, Versuche in Replikaten möglich.
Verwendete Proteinquelle	Proteinextraktion aus Primärtumoren (10 ⁷ Zellen)	Proteinextraktion aus Tumorzelllinien (10 ⁸ Zellen)	Zelllinien sind „unbegrenzt“ verfügbar. Erhöhung des Proteinpools ermöglicht die Detektion seltener Proteine.
Auftrennung der IPs	18cm IPG x 18cm 2. Dimension (324cm ² Trennfläche)	24cm IPG x 20cm 2. Dimension (480cm ² Trennfläche)	
Detektion	Immunpräzipitation, Silberfärbung, Coomassie	Immunpräzipitation, Silberfärbung	-
Spezifitätskontrolle	IP mit gesundem Gewebe	IP mit IgG-Pool von 100 gesunden Spendern	Gesundes Gewebe aus ethischen Gründen nicht verfügbar.
Sensitivität	Limitiert durch Silberfärbung	Limitiert durch Silberfärbung	-

Mit der so optimierten Methode konnte gezeigt werden, dass die Selektion der Antigene mittels IP vor der 2D-Elektrophorese ein geeigneter biologischer Filter ist. Wie bei der autolog durchgeführten AMIDA Methode, resultiert die IP in einer drastischen Reduktion der Komplexität des Proteingemisches.

Die neue allo-AMIDA-Strategie wurde an Patientenseren angewendet, die an malignen Erkrankungen der oberen Atemwege leiden. Durchschnittlich konnten auf diesen 2D-Gelen zwischen 800 und 1100 Spots detektiert werden. Der Vergleich von Präzipitaten von Tumorpatienten zu gesunden Spendern zeigte ca. 99,5% identische Spots. Nur ca. 5-6 Spots pro Gel, also 0,5%, wurden selektiv auf IPs von Tumorpatienten detektiert. Diese Proteine, welche sich selektiv mit IgGs von Tumorpatienten isolieren ließen, wurden als potenzielle TAs betrachtet und weiter analysiert.

Die Vorteile der neu etablierten allo-AMIDA-Methode liegen sicherlich in der hohen Reproduzierbarkeit und in der Tatsache, dass das System ebenfalls unabhängig von der Tumorentität anwendbar ist. Einzige Vorraussetzungen sind Serumproben von Patienten und Karzinomzelllinien der entsprechenden Entität. Mittlerweile sind diese jedoch für die unterschiedlichsten Tumorarten etabliert und verfügbar.

Neben malignen Erkrankungen ist eine Anwendung auch für andere Erkrankungen, bei denen spezifische humorale Immunantworten induziert werden, denkbar. Mögliche Beispiele wären Autoimmunerkrankungen (Goodnow *et al.*, 2005; Scofield, 2004) und Infektionen mit Pathogenen. Eine xenogene Anwendung wurde für die ursprüngliche AMIDA-Technik am Beispiel der Lyme-Borreliose (*Borrelia burgdorferi*) gezeigt (persönliche Mitteilung: Dr. Olivier Gires). Seren immunisierter kongener Mausstämmen wurden zur IP von Spirochäten-Lysaten herangezogen. Abhängig von der Menge inokulierter Bakterien enthielten Mausseren *Borrelia burgdorferi*-spezifische Immungobuline, welche eine Isolierung des jeweiligen Antigens erlaubten.

Der große Vorteil der allo-AMIDA-Strategie – die Verwendung allogener Zelllinien in Kombination mit Patientenseren – ist gleichzeitig der größte Nachteil der Technik: Die allo genen Reaktionen zwischen Proteinen aus Zelllinien mit Serumantikörpern ist eine Mischung verschiedenster Bindungen und Interaktionen, deren genaue Zusammensetzung unbekannt ist. Jedoch sollte die entsprechende Kontrolle bei allo-AMIDA, also IgGs gesunder Spender, vergleichbare allogene Reaktionen aufweisen.

Die Lysate aus Karzinomzelllinien für die IPs stellen eine homogene Proteinquelle dar. Tumorbiospsien hingegen sind in der Regel sehr heterogen aufgebaut. Neben Tumorzellen enthalten sie eine große Zahl infiltrierender nicht-maligner Zellen (Balkwill, 2004) und Binde-

gewebe, die für die IP nicht erwünscht sind. Andererseits entsprechen Karzinomzelllinien nicht in allen Belangen der *in vivo* Situation eines Karzinoms. So wird ein solider Tumor nicht nur durch die Masse an Tumorzellen definiert, hinzukommen Zell-Zell-Kontakte, infiltrierende nicht-maligne Zellen, Stroma, etc., die den Gesamttumor beeinflussen (Gieseg *et al.*, 2004).

Nach der Identifizierung potenzieller TAs mittels allo-AMIDA, aber auch anderer Strategien wie SEREX und PROTEOMEX, ist stets eine Validierung erforderlich. Diese Validierung betrifft einerseits die funktionelle Analyse der potenziellen TAs zur Klärung, warum sich in Patientenserum spezifische Antikörper gegen ein Antigen befinden. Eine weitere Validierung betrifft die quantitative Betrachtung der spezifischen humoralen Antwort gegen TAs. Es wurde gezeigt, dass diese spezifischen Antikörper als zirkulierende Biomarker genutzt werden können (Fernandez Madrid, 2005; Lueking *et al.*, 2003; Mintz *et al.*, 2003). Im Falle von AMIDA, wurde dies für die TAs cK8 (Gires *et al.*, 2004) sowie E-FABP (Rauch *et al.*, 2004) gezeigt. Erhöhte Konzentrationen cK8-spezifischer Antikörper konnten in ca. 37% aller untersuchten Patienten mit Karzinomen des Hals-Rachen-Raumes beobachtet werden. Im Falle von E-FABP zeigten 20% der Patienten erhöhte Konzentrationen E-FABP-spezifischer Antikörper im Serum. Diese spezifischen humoralen Antworten gegen TAs könnten als vielversprechende, zirkulierende Biomarker genutzt werden. Ein Biomarker allein besitzt jedoch kaum eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für einen routinemäßigen Einsatz in der Frühdiagnostik. Deshalb ist es ein Ziel in der Arbeitsgruppe, die spezifischen humoralen Antworten mehrerer Biomarker zu kombinieren.

Eine mögliche Weiterentwicklung von AMIDA wäre die Verwendung der DIGE-Technik (differential gel electrophoresis) an Stelle der Silberfärbung von 2D-Gelen (Tonge *et al.*, 2001). Zwei Protein-Proben – im Fall von AMIDA eine IP mit Tumor-IgGs und eine Kontroll-IP – werden mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gefärbt und in einem 2D-Gel gemeinsam aufgetrennt. Hierdurch können technisch bedingte Unterschiede zwischen 2D-Gelen umgangen werden. DIGE-Farbstoffe besitzen zudem eine höhere Sensitivität als die herkömmliche Silberfärbung.

Membranproteine mit mehreren Transmembrandomänen und andere stark hydrophobe Proteine wurden aufgrund der Begrenzungen der 2D-Technik nicht identifiziert. Da diese aber für Therapieansätze mit monoklonalen Antikörpern sehr interessant sind, ist es erstrebenswert, allo-AMIDA dahingehend zu optimieren. Denkbar wäre die IP von TAs aus Membranfraktionen von Tumorzelllinien mit Serumantikörpern und die nachfolgende Auftrennung der Antigene mittels HPLC. Einzelne HPLC-Fractionen könnten anschließend in einem eindimensio-

nenen Gel aufgetrennt und visualisiert werden. Eine Kombination dieses Ansatzes mit der DIGE-Technologie ist ebenfalls andenkbar.

5.2. Identifizierung von Tumorantigenen des Kopf-Hals-Bereiches mittels allo-AMIDA

Nach Etablierung der allo-AMIDA-Technik war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, neue Tumorantigene im Bereich der Hals-Rachen-Karzinome zu identifizieren, zu validieren und zu charakterisieren. Bei diesen Karzinomen sind bis jetzt kaum Tumorantigene beschrieben worden (Quon *et al.*, 2001). Bekannte tumorassoziierte bzw. tumorspezifische Antigene für diese Tumorentität sind p53 (Boyle *et al.*, 1993), EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) (Armstrong and Eck, 2003), CEA (carcinoembryonic antigen) und SCC (squamous cell carcinoma antigen) (Walther *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer geringen Spezifität bzw. Sensitivität sind diese jedoch nicht als diagnostische und prognostische Marker für diese Entität geeignet.

Allo-AMIDA wurde mit acht Seren von Patienten, die an malignen Erkrankungen des Hals-Rachen-Bereiches leiden, durchgeführt. Die IP erfolgte mit Lysaten aus den Plattenepithelkarzinomzelllinien FaDu und PCI-1. Diese Zelllinien wurden ursprünglich aus Tumorzellen des Hals-Rachen-Bereiches generiert und stellen somit eine valide Proteinquelle für die IP dar. Auf diese Weise konnten auf den 2D-Gelen insgesamt 37 Proteine detektiert werden, die ausschließlich mit Antikörpern von Patienten präzipitierten. Proteine, wie leichte und schwere Immunglobulinketten, wurden nicht als potenzielle TAs eingeordnet. 27 der 37 Proteine konnten mit signifikanten MOWSE-Scores mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Dies entspricht einer Identifizierungsquote von ca. 73% aller mittels Peptide-Mass-Fingerprint (PMF) identifizierten Proteine. Eine weitere Optimierung dieser hohen Quote wäre durch die Kombination von PMF-Massenspektren mit Peptid-Sequenzierungen eines MS/MS-Massenspektrometers möglich. Ein MALDI-ToF-ToF-Massenspektrometer steht mittlerweile zur Verfügung, die Anwendungen werden derzeit auf dieses Gerät optimiert.

Einige Proteine wurden mit mehreren Seren und in verschiedenen Tumorzelllinien isoliert, so dass sich 12 potenzielle TAs ergeben. Eine Einteilung der Proteine erfolgte nach Literaturstudien in folgende 2 Gruppen: 1. Proteine, die bereits als TAs beschrieben oder diskutiert wurden bzw. mit Tumoren assoziiert sind und 2. Proteine, die *bis dato* nicht als TAs beschrieben wurden oder mit Tumoren assoziiert sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Neun der 12 allo-AMIDA-Antigene weisen laut Literatur bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine erhöhte Expression auf bzw. sind mit Tumoren assoziiert. Fünf Antigene wurden bereits als Tumorantigene identifiziert. Grb-2 ist das einzige bereits beschriebene Protein, dass mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches assoziiert ist (starke Überexpression bei Nasopharynxkarzinomen).

Tabelle 5.2: allo-AMIDA-Antigene, die bereits bekannte Tumorantigene sind bzw. mit Tumoren und Karzinogenese assoziiert sind.

allo-AMIDA-Antigen	TA / Tumor- / Karzinogenese-assoziiert	Referenzen
e-FABP	Starke Expression bei Blasen-Plattenepithelkarzinomen und Pankreas-Adenomkarzinomen. Bei Prostata-Karzinom mit Metastasierungsgrad assoziiert.	(Adamson <i>et al.</i> , 2003; Ostergaard <i>et al.</i> , 1997; Sinha <i>et al.</i> , 1999)
Cytidine Deaminase	Erhöhte Expression bei Magenkarzinom und akuter lymphatischer Leukämie (ALL).	(Durak <i>et al.</i> , 1994; Hippo <i>et al.</i> , 2001; Sun <i>et al.</i> , 2003)
Grb 2	Erhöhte Expression bei Brustkrebs und Nasopharynxkarzinom.	(Fung <i>et al.</i> , 2000; Kairouz and Daly, 2000; Verbeek <i>et al.</i> , 1997)
TRIP-1	Erhöhte Expression bei Leberkarzinom. Transformierende Eigenschaften.	(Huang <i>et al.</i> , 2004)*
PSP1, α	-	
hnRNP H	Erhöhte Expression bei Pankreas-Adenokarzinom, Leber- und Magenkarzinom.	(Honore <i>et al.</i> , 2004)*
Tropomyosin 3 Isoform 2	TA in Neuroblastomen. Assoziiert mit Kolonkarzinomen.	(Lin <i>et al.</i> , 2002)
Profilin II	-	
Cortactin	SEREX-TA bei Brustkrebs.	(Lagarkova <i>et al.</i> , 2000)
Tubulin beta 1	TA in Neuroblastomen.	(Prasanna <i>et al.</i> , 2000)
BiP protein	TA in Prostata-Karzinomen. BiP-spezifische Antikörper im Serum korrelieren mit der Tumorphase und Prognose.	(Mintz <i>et al.</i> , 2003)
Hsp27	PROTEOMEX-TA bei Nierenzellkarzinom (RCC), überexprimiert bei Magenkarzinomen, Karzinomen der Speiseröhre. Spezifische Antikörper bei Brustkrebs.	(Conroy <i>et al.</i> , 1998; Kapranos <i>et al.</i> , 2002; Lambot <i>et al.</i> , 2000; Lichtenfels <i>et al.</i> , 2002)

* Publikation erfolgte nach Identifizierung / im Verlauf der Charakterisierung der allo-AMIDA-Antigene

Zum Zeitpunkt der Identifizierung der potenziellen Antigene war laut Literatur für vier Antigene (PSP-1, hnRNP H, Profilin II, TRIP-1) keine Assoziation mit Tumoren beschrieben.

Die Tatsache, dass neun der 12 Antigene mit verschiedenen Tumorentitäten assoziiert sind und fünf allo-AMIDA-Antigene beschriebene Tumorantigene sind, unterstreicht die Eignung von allo-AMIDA als Technik zur TA-Identifizierung. Einige der TAs wurden mit Serumantikörpern mehrerer Patienten immunopräzipitiert. Dies läßt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um sogenannte „shared tumor antigens“ handelt, also Antigene, die in einer Vielzahl von Patienten gefunden werden (Van den Eynde and van der Bruggen, 1997).

Zu beachten ist, dass dieses Screening nur mit einer geringen Fallzahl durchgeführt wurde (acht Patientenseren / zwei Zelllinien). Allo-AMIDA ist somit eine schnelle und effiziente Strategie zur Antigenidentifizierung. Die Methode soll mit weiteren Seren und Tumorzelllinien durchgeführt werden, so dass zu hoffen ist, neue Antigene identifizieren zu können. Die Methoden 2D-Elektrophorese und Massenspektrometrie als Haupttechniken von allo-AMIDA sind teilweise automatisierbar, so dass größere Patientenzahlen in einer kurzen Zeit analysiert werden können.

5.3. Validierung der allo-AMIDA-Antigene

Neben bekannten TAs und Proteinen, die in einigen Tumorentitäten stark exprimiert werden, wurden auch vier Antigene (PSP-1, hnRNP H, Profilin II, TRIP-1) identifiziert, für die zum Zeitpunkt der Identifikation keine Assoziation mit Tumoren beschrieben war. Die potenziellen Tumor-Antigene hnRNP H und TRIP-1 wurden in der Arbeitsgruppe detaillierter untersucht.

Wie bereits dargestellt, ist bei der Durchführung von allo-AMIDA-Screens eine nachfolgende Validierung unumgänglich. Es stellt sich die Frage, warum sich in Patientenseren spezifische Antikörper gegen diese Antigen befinden, die eine Identifizierung ermöglichten. Laut (Disis and Cheever, 1996) ist neben Mutationen im Protein und aberranter Expression vor allem das Expressionsmaß der Proteine für die spezifische humorale Antwort von besonderer Bedeutung. Die Expression der potenziellen Antigene Grb-2, Hsp27, BiP und hnRNP H wurde mittels immunhistochemischer Schnittfärbungen beurteilt. Das Protein Grb-2 war in allen untersuchten primären Hals-Rachen-Karzinomen und Tumormetastasen stark überexprimiert. Die Expression war ausschließlich auf die Karzinomzellen beschränkt. In gesunden Epithelien der gleichen Entität konnte nur eine schwache Expression festgestellt werden, die ausschließlich auf die proliferierenden Zellen der Basalzellschicht begrenzt war. Bei Brustkrebs

(Fung *et al.*, 2000; Kairouz and Daly, 2000; Verbeek *et al.*, 1997) und bei Nasopharynxkarzinomen (Fung *et al.*, 2000) wurde bereits eine erhöhte Expression von Grb-2 in Karzinomzellen beschrieben. Im Bereich des Hals-Rachen-Raumes war jedoch die Überexpression von Grb-2 bei Karzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe *bis dato* nicht bekannt.

Das Antigen Hsp27 war ebenfalls in Tumoren und Metastasen stark exprimiert, wobei die Expression auf die Karzinomzellen beschränkt war. In gesunden Epithelien war die Expression auf Bereiche des suprabasalen Epithels beschränkt. Diese Expression konnte bereits von Lambot und Kollegen für gesundes Epithel der Speiseröhre beobachtet werden (Lambot *et al.*, 2000). Hsp27 ist ein bekanntes TA in einigen Tumorentitäten und wird u.a. in Magenkarzinomen und Karzinomen der Speiseröhre stark überexprimiert (Conroy *et al.*, 1998; Kapranos *et al.*, 2002; Lambot *et al.*, 2000; Lichtenfels *et al.*, 2002). Eine Assoziation der Hsp27-Expression mit Karzinomen des Hals-Rachen-Bereiches ist ebenfalls mehrfach beschrieben (He *et al.*, 2004; Leonardi *et al.*, 2002).

Das Antigen BiP zeigte in gesunden Epithelien, Tumoren und Metastasen des Hals-Rachen-Raumes eine nahezu ubiquitäre und ähnlich hohe Expression. Mintz und Kollegen zeigten, dass BiP ein Tumorantigen beim Prostatakarzinom ist (Mintz *et al.*, 2003). Tumore und Metastasen dieser Entität wiesen eine starke Expression auf, gesundes Prostatagewebe hingegen zeigte nur eine schwache Expression. BiP-spezifische Antikörper im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom korrelieren mit der Tumorprogression und Prognose (Mintz *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Prostatakarzinomen ist BiP für Karzinome des Hals-Rachen-Bereiches kein geeigneter Marker.

Die Expression des Antigens hnRNP H wurde auf mRNA-Ebene mittels *in-situ*-Hybridisierungsexperimenten (ISH) und auf Proteinebene mittels immunhistochemischen Experimenten (IHC) detaillierter untersucht. Unabhängig von der exakten Lokalisation der Tumorentität im Hals-Rachen-Bereich zeigten zwischen 60 und 100% der analysierten Biopsien eine mittlere bis sehr starke hnRNP H Expression, wobei die Expression des Proteins auf die Zellkerne von Karzinomzellen beschränkt war. In Metastasen war hnRNP H ebenfalls stark exprimiert. In gesundem Rachenepithel hingegen konnte keine bzw. eine sehr schwache Expression festgestellt werden, die ausschließlich auf Zellen der proliferierenden Basalzellschicht begrenzt war. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass hnRNP H sowohl auf Transkript- als auch Proteinebene in Tumoren und Metastasen des Hals-Rachen-Raumes eine Überexpression aufweist. Interessanterweise war im Vergleich zu gesundem Epithel bereits in hyperplastischen Epithelien eine deutlich erhöhte hnRNP H-Expression zu beobachten, die mit fortschreitender Karzinogenese zunahm. Die Überexpression scheint also bereits zu einem

frühen Zeitpunkt der Karzinogenese einzusetzen. Diese bereits in frühen Tumorstadien einsetzende Überexpression wäre für die Frühdiagnose entstehender Karzinome von Bedeutung. Die möglichst frühe Erkennung von Tumoren ist eine der wichtigsten Voraussetzungen, um die Prognose zu verbessern (Hunter *et al.*, 2005; Wulfschlegel *et al.*, 2003).

Zum Zeitpunkt der Identifizierung und Validierung der allo-AMIDA-Antigene war eine Überexpression von hnRNP H bei Karzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe der oberen Atemwege nicht beschrieben. Honoré und Kollegen zeigten im Jahr 2004, dass Pankreas-, Leber- und Magenkarzinome eine erhöhte hnRNP H-Expression aufweisen (Honore *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Analysen ist interessant, dass alle getesteten Karzinome und insbesondere Metastasen sehr starke Grb-2- und hnRNP H-Überexpressionen aufwiesen. Dies macht sowohl Grb-2 als auch hnRNP H zu potenten Markern für die Bestimmung von disseminierten okkulten Tumorzellen. Die Expression von Hsp27 ist zwar spezifisch für alle getesteten Hals-Rachen-Tumore und deren Metastasen. Als Marker erscheint Hsp27 jedoch ungeeignet, da auch Zellen des suprabasalen Epithels eine starke Expression aufwiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Validierungen geben Hinweise darauf, weshalb einige der analysierten Proteine eine humorale Antwort hervorrufen. Hsp27, Grb-2 und hnRNP H werden zwar in gesunden Geweben exprimiert, sind aber im Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches deutlich überexprimiert. Es wird diskutiert, dass diese Überexpression zu einer erhöhten Präsentationsdichte von immunogenen Peptiden dieser Proteine auf den Tumorzellen und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Immunantwort gegen diese hoch exprimierten, aber strukturell natürlichen Proteine (Spiotto *et al.*, 2003). Gelangen Antigene durch Sezernierung bzw. Ausschüttung nach Apoptose und Nekrose oder durch Streuung von Tumorzellen in drainierende Lymphknoten, können sie dort direkt zu einer Aktivierung von T- und B-Zellen führen. Ebenfalls könnte die Ursache für die humorale Antwort gegen das Antigen hnRNP H die starke Überexpression in neoplastischem Rachenepithel sein.

Nach diesen Überlegungen würde man die allo-AMIDA-Antigene Hsp27, Grb-2 und hnRNP H der Klasse der Überexpressionsantigene (Spiotto *et al.*, 2003; Van den Eynde and van der Bruggen, 1997) zuordnen. Andere Möglichkeiten der Tumorantigenentstehung, wie Mutationen der entsprechenden Gene, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

Für eine Vielzahl nukleärer Proteine wurden humorale und zelluläre Immunantworten beschrieben (Moutsopoulos *et al.*, 2000; Stinton *et al.*, 2004). Diskutiert wird, dass im Wesentlichen die starke Expression einiger nukleärer Proteine für diese spezifische humorale Antwort

verantwortlich ist. Diese hohe Expression führt zu einer erhöhten Präsentationsdichte von immunogenen Peptiden dieser nukleären Proteine auf der Oberfläche der Tumorzellen und zu einer verstärkten Kreuzpräsentation durch APCs. Dadurch wird die Immunantwort gegen diese hoch exprimierten Proteine aktiviert (Spiotto *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit ist die Primärstruktur der Proteine selbst. Es wird diskutiert, dass die Nukleinsäure-bindenden Domänen der nukleären Proteine mit vielen basischen Aminosäure-Resten stark immunogene Epitope darstellen (Caporali *et al.*, 2005). Dies erklärt auch die Tatsache, dass einige nukleäre Proteine bekannte Antigene bei Autoimmunerkrankungen sind (Caporali *et al.*, 2005). So finden sich erhöhte Level spezifischer Antikörper gegen hnRNPs – sog. *antinuclear antibodies* (ANA) – u. a. bei Rheumatoider Arthritis, Systemischem Lupus Erythematosus und Systemischer Sklerose. Autoantikörper gegen hnRNP H im Rahmen von Autoimmunerkrankungen sind *bis dato* nicht beschrieben. Spezifische ANA und entsprechende Autoantikörper konnten, neben Autoimmunerkrankungen, auch bei malignen Erkrankungen wie Lungenkarzinom und Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches detektiert werden (Fernandez Madrid *et al.*, 2005). Es besteht also die Problematik, dass spezifische humorale Antworten sowohl bei malignen Erkrankungen als auch bei anderen entzündlichen, benignen Erkrankungen gefunden werden. Bei der Durchführung von allo-AMIDA kann nicht unterschieden werden, ob ein Antigen mit tumorspezifischen Antikörpern oder Autoantikörpern immunpräzipitiert wurde. Dies verdeutlicht, dass eine gründliche Validierung potenzieller Tumorantigene unumgänglich ist. Es muss gezeigt werden, dass ein Antigen tatsächlich mit der Tumorerkrankung assoziiert ist und nicht ebenfalls bei entzündlichen Erkrankungen. Zum anderen weist diese Problematik darauf hin, wie schwierig es ist, zirkulierende Antikörper gegen TAs als Marker zu benutzen. Bei quantitativen Messungen spezifischer humoraler Antworten ist eine Überlagerung von Antworten gegen natürliche Autoantigene (NAA), Autoimmunantikörper und tumorspezifische Antikörper nicht auszuschließen.

5.4. Funktionelle Charakterisierung des allo-AMIDA Antigens hnRNP H

Die Isolierung von Proteinen wie Hsp27, hnRNP H und Grb-2 mittels allo-AMIDA unterstreicht die Eignung der Strategie zur Identifizierung neuer Tumorantigene.

hnRNP H war *bis dato* nicht im Zusammenhang mit Tumoren oder Karzinogenese beschrieben. Daher wurde hnRNP H in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersucht.

Wie bereits beschrieben, ist hnRNP H stark überexprimiert in Karzinomen des Hals-Rachen-Bereiches im Vergleich zu gesunden Epithelien der gleichen Lokalisierung. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Überexpression spezifisch für diese Tumorentität ist oder ob hnRNP H auch in anderen malignen Erkrankungen erhöht exprimiert wird. Zudem stellte sich die Frage, in welchen gesunden humanen Geweben hnRNP H exprimiert wird.

Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass hnRNP H in allen getesteten humanen Karzinomzelllinien gleichermaßen exprimiert ist, darunter die Entitäten Hals-Rachen-Raum, Niere, Brust, Zervix, Lunge. Auch eine nicht-maligne primäre Fibroblastenzelllinie exprimiert hnRNP H.

Aufgrund dieser ubiquitären Expression in den getesteten malignen Zelllinien wurde die hnRNP H-Expression mittels immunhistochemischer Schnittfärbungen weiterer Karzinomentitäten und entsprechender Normalgewebe beurteilt. hnRNP H war bei den untersuchten Kolon-, Pankreas- und Mamma-Karzinomen stark überexprimiert. Die Expression in nicht-malignen Geweben war sehr heterogen. Neben Geweben, die nahezu keine Expression aufwiesen (Muskel, Leber, Niere, Pankreas), waren in einigen Geweben auch Zellen mit hoher hnRNP H-Expression zu beobachten (Lunge, Magen, Darm, Testis). In Anlehnung an diese Befunde zeigten Honoré und Kollegen ebenfalls die stärkere Expression von hnRNP H in ausgesuchten Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben (Honoré *et al.*, 2004). Außerdem zeigten diese Arbeiten, dass hnRNP H neben dem Zellkern auch im Zytoplasma lokalisiert. Dieser Befund konnte von uns, auch unter der Verwendung der Laser Scanning Mikroskopie (Daten nicht gezeigt), nicht bestätigt werden. hnRNP H lokalisierte stets im Zellkern. Eine Ursache hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Färbetechniken im Rahmen der IHC sein.

Warum ist hnRNP H in vielen malignen Erkrankungen überexprimiert?

Die *bis dato* spärlichen Informationen zu diesem Protein geben darüber keinen Aufschluss. hnRNP H gehört zur Gruppe der *heterogenous ribonucleoproteins* (hnRNPs), einer Proteinfamilie, die aus mehr als 20 Mitgliedern besteht. Die jeweiligen Proteine der Familie sind mit den Buchstaben *A bis U* gekennzeichnet (Krecic and Swanson, 1999; Siomi and Dreyfuss, 1997). Die Proteine sind durch den stark modularen Aufbau charakterisiert. Ein Großteil der hnRNPs besteht neben einer oder mehrerer RNA-Bindungsdomänen (RRM, RNA recognition motif) und aus Hilfsdomänen (AUX, auxiliary domains), die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind. Traditionell sind hnRNPs am Metabolismus von prä-mRNAs beteiligt. Neueste Untersuchungen zeigten, dass hnRNPs weitere wichtige Funktionen in der Zelle übernehmen. So wurde beschrieben, dass hnRNPs an der Bindung und Regulation reifer

mRNA beteiligt sind (Shih and Claffey, 1999) und als Transkriptionsfaktoren fungieren (Chen *et al.*, 1998; Schullery *et al.*, 1999) können.

Für einige hnRNPs konnte bereits eine Assoziation mit Tumoren und Karzinogenese nachgewiesen werden. So wurde bereits für die Proteine hnRNP A1, hnRNP P2 und hnRNP E2 eine Assoziation mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) bzw. akuter myeloischer Leukämie (AML) gezeigt (Iervolino *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2000; Perrotti *et al.*, 1998; Perrotti *et al.*, 2002). In frühen Stadien des Lungenkrebs ist hnRNP A2/B1 überexprimiert (Hamasaki *et al.*, 2001; Sueoka *et al.*, 1999). Eine erhöhte Expression von hnRNP K findet sich bei höhergradigem Brustkrebs, die mit einer erhöhten Proliferation der Brustkrebszellen einhergeht und eine Koloniebildung in Soft-Agarose erlaubt (*anchorage independent growth*) (Mandal *et al.*, 2001). Gouble und Kollegen konnten zeigen, dass die Überexpression von hnRNP D unter der Kontrolle des beta-Actin-Promotors zur Entwicklung undifferenzierter Sarkome in Mäusen führte (Gouble *et al.*, 2002).

HnRNP H gehört, zusammen mit hnRNP H', hnRNP F und hnRNP 2H9, zu einer Unterfamilie von hnRNPs, die sich durch eine spezifische Struktur der RNA-Bindungsdomäne (quasi-RRM) auszeichnen (Honore *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1994). Die vier Mitglieder der Proteinfamilie haben eine ähnliche Struktur (Honore *et al.*, 1995) und besitzen ein gemeinsames RNA-Bindungsmotiv (GGGA) (Caputi and Zahler, 2001). Es wurde beschrieben, dass hnRNP H am zelltypabhängigen, alternativen Spleißen von mindestens zwei prä-mRNAs beteiligt ist: hnRNP H fungiert als Spleißaktivator der c-src prä-mRNA in neuronalen Zellen, wobei das Exon N1 des c-src-Gens aktiviert und somit exprimiert wird (Chou *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist hnRNP H für die Repression des Spleißens des Exons 7 der beta-Tropomyosin prä-mRNA in Nicht-Muskelzellen verantwortlich (Chen *et al.*, 1999). HnRNP H bindet sowohl in Exonbereichen (c-src) als auch in Introns (beta-Tropomyosin). Aus diesen Gründen wird zur Zeit in der Literatur eine Funktion von hnRNP H beim alternativen Spleißen von prä-mRNAs als sog. „Exon-Spleiß-Silencer“ (ESS) oder „Intron-Spleiß-Enhancer“ (ISE) weiterer Gene kontrovers diskutiert (Matlin *et al.*, 2005).

Folglich konnte *bis dato* dem Protein hnRNP H keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Zur Funktionsanalyse wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein zelluläres System etabliert.

Im Rahmen von RNAi Experimenten mit small-interfering RNAs (siRNAs) sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Hemmung der hnRNP H-Expression Auswirkungen auf die Zellen hat. Mittels spezifischer siRNAs konnte die Expression von hnRNP H auf Transkriptebene deutlich reduziert werden. Diese Verminderung der mRNA-Menge resultierte erwar-

tungsgemäß in einer stark verringerten Proteinexpression von hnRNP H. Dieser Effekt war über vier Tage nach transienter Transfektion mit siRNAs deutlich zu beobachten, so dass in diesem zeitlichen Rahmen (ein bis fünf Tage nach Transfektion der Zellen) alle weiteren Experimente durchgeführt werden konnten.

Ein zelluläres Überexpressionssystem zur funktionellen Analyse von hnRNP H konnte nicht etabliert werden. Trotz der Verwendung starker Promotoren zur Expression (CMV, SV40, Kombination aus CMV und SV40) konnte eine verstärkte Expression mittels verschiedener eukaryotischer Expressionssysteme nicht erzielt werden. Ein Grund hierfür könnte die bereits hohe endogene hnRNP H-Expression der verwendeten Zelllinien sein. Die Etablierung eines solchen zellulären Systems ist jedoch in Planung, wobei anstelle stabiler Transfektionen eine kurzfristige, starke Überexpression mittels transienter Transfektion mit Überexpressionsplasmiden erfolgen soll.

5.4.1. Die Repression von hnRNP H führt zu Apoptose

Erste durchlichtmikroskopische Analysen von hnRNP H-reprimierten Zellen ergaben, dass die Hemmung mit einem spezifischen Phänotyp einhergeht. Die hnRNP H-Repression führt in den Karzinomzelllinien GHD, HeLa und FaDu zu verringerten Zellmengen. Dieser Effekt ließ sich quantifizieren und resultierte in drastisch erhöhten Verdoppelungszeiten bei den analysierten Zelllinien GHD (+70%) und HeLa (+450%), jedoch nicht bei HEK-293-Zellen (+0%). Dieser Effekt auf das Wachstum war unabhängig von der metabolischen Aktivität der Zellen. Interessant ist, dass die Repression von hnRNP H nicht in allen untersuchten Zelllinien mit diesem Phänotyp einhergeht. In HEK-293-Zellen zeigte sich kein Effekt auf das Wachstum. Technisch bedingte Probleme bei der transienten Transfektion sind auszuschließen. Im Gegensatz zu GHD, FaDu und HeLa Zellen, ist HEK-293 keine klassische Tumorzelllinie epithelialen Ursprungs. Die Zelllinie geht aus embryonalen Nierenzellen hervor, die Transformation erfolgte mit Fragmenten adenoviraler DNA (Adenovirus 5) (Graham *et al.*, 1977). Diese Transformation könnte eine Ursache sein, warum die Zellen mit verminderter hnRNP H-Expression wachsen können. Eine weitere Möglichkeit wäre eine redundante Funktion anderer Proteine der hnRNP-Familie, was *bis dato* noch nicht untersucht wurde.

Mittels Komplementierungsexperimenten konnte in den Zelllinien GHD und HeLa gezeigt werden, dass der beschriebene Phänotyp spezifisch für die hnRNP H-Repression ist. Eine Überexpression von hnRNP H mit Hilfe geeigneter Expressionsplasmide in siRNA-behandelten Zellen führte zu einer Reversion des Phänotyps.

Detaillierte Analysen mittels PI-FACS und Annexin-V-FACS zeigten, dass die Hemmung der endogenen hnRNP H-Expression in GHD- und HeLa-Zellen zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt. Die beiden Methoden führten zu teilweise leicht divergenten Ergebnissen. Bei Messungen mittels PI-FACS zeigte sich stets ein Anstieg der Apoptoserate nach hnRNP H-Hemmung, während die Annexin-V-FACS-Analyse der HeLa-Zellen am Tag 5 nach Transfektion eine verminderte Apoptoserate zeigte. Diese leicht divergenten Ergebnisse sind auf die Art der Messung zurückzuführen: Annexin-V auf der Zelloberfläche ist ein früher Marker der Apoptose, mittels PI-FACS wird der DNA-Gehalt von Zellen und fragmentierte DNA (sub-G₁) quantifiziert, was einen späten Zeitpunkt der Apoptose darstellt.

Die Etablierung eines stabilen Systems mittels antisense-RNAs bzw. sog. short-hairpin RNAs zur stabilen Repression von hnRNP H war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Dies ist schlüssig, da die Repression von hnRNP H in den verwendeten Zelllinien mit Ausnahme von HEK-293-Zellen letal ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hemmung von hnRNP H mit einer stark erhöhten Apoptoserate in Tumorzelllinien einhergeht. Patry und Kollegen konnten einen vergleichbaren Phänotyp nach der Hemmung von hnRNP A1/A2 zeigen. hnRNP A1/A2 ist ebenfalls in einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert. Die Hemmung von hnRNP A1/A2 mittels spezifischer siRNAs induzierte Apoptose in humanen Tumorzelllinien, jedoch nicht in normalen, sterblichen Zellen (Patry *et al.*, 2003).

Nach diesen Experimenten und neuen Informationen zu hnRNP H bleibt immer noch unklar, warum dieses Protein in einigen Tumorentitäten überexprimiert vorliegt. Eine Möglichkeit wäre, dass durch die hohe Expression die Apoptose gehemmt wird und ein anti-apoptotisches Milieu geschaffen wird (Hanahan and Weinberg, 2000). Ziel weiterer Arbeiten ist daher die Nachahmung der *in vivo*-Situation. Bewirkt eine starke Expression von hnRNP H einen Wachstumsvorteil für die Zellen oder steht das Protein gar im kausalen Zusammenhang mit der Tumorentstehung? Zur Beantwortung dieser Fragen sollen maligne Zelllinien und nicht-maligne sterbliche gesunde Zellen mittels transienter oder stabiler Überexpression von hnRNP H behandelt werden.

5.4.2. Potenzielle Targets von hnRNP H

Die vorausgegangenen Experimente zeigten, dass die Verringerung der hnRNP H-Expression in einigen Tumorzelllinien mit einem apoptotischen Phänotyp einhergeht. War dieses Ergebnis ein direkter Effekt oder führte der Verlust des Proteins indirekt zum programmierten Zelltod? Diskutiert wird zur Zeit, ob hnRNP H am alternativen Spleißen von prä-mRNAs als sog.

Exon-Spleiß-Silencer (ESS) oder Intron-Spleiß-Enhancer (ISE) fungieren könnte (Matlin *et al.*, 2005). Auf dem Hintergrund dieser Daten und dem oben beschriebenen apoptotischen Phänotyp stellte sich die Frage, ob hnRNP H am alternativen Spleißen von prä-mRNAs beteiligt ist, die im Bereich der Apoptose eine Rolle spielen. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels Oligonukleotid-Microarrays durchgeführt, bei der das Transkriptom von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der hnRNP H-Hemmung quantitativ analysiert wurde. Besonders wichtig für dieses Experiment war der Zeitpunkt, an dem die RNA aus den transfizierten Zellen isoliert wurde. Ziel des Experimentes war, möglichst die Ursache des apoptotischen Phänotyps anhand deregulierter Gene zu erkennen, und nicht die Messung des apoptotischen Phänotyps selbst. Die Isolierung der RNAs erfolgte daher 65h nach Transfektion, also zu einem Zeitpunkt, an dem der beobachtete apoptotische Phänotyp gerade noch nicht eingesetzt hatte. Rücksprachen mit dem Hersteller der Arrays ergaben, dass die verwendeten Microarrays technisch ursprünglich nicht für die Analyse differenziell gespleißter mRNA-Isoformen ausgelegt sind. Alle bekannten Isoformen einer RNA werden – falls technisch möglich – mittels eines hybridisierten Oligonukleotids parallel erfasst. Dennoch könnte die Regulation von mRNAs Rückschlüsse auf alternatives Spleißen zulassen. Da dieses Arrayexperiment nur einmal durchgeführt wurde, erfolgte eine eher „konservative“ Analyse deregulierter Gene mit einem signifikanten Faktor von drei. Bei Verwendung von Replikaten werden die Analysen der Arrays üblicherweise mit einem Deregulationsfaktor von zwei durchgeführt. Mit Hilfe dieser Genexpressionsanalyse konnten erstmals Gene identifiziert werden, die bei verminderter hnRNP H-Expression reguliert werden. Aufgrund des bekannten apoptotischen Phänotyps nach hnRNP H-Hemmung wurden mit Hilfe der PANTHER-Software zunächst nur solche deregulierte Gene näher untersucht, die im Bereich der Apoptose eine Rolle spielen. Im Bereich Apoptose waren neun Gene signifikant reprimiert, acht Gene wurden nach Hemmung von hnRNP H induziert. Eine Ursache für die Beobachtung einer Inhibition und Induktion könnte die diskutierte duale Rolle von hnRNP H als Exon-Spleiß-Silencer (ESS) und Intron-Spleiß-Enhancer (ISE) sein. Des weiteren können indirekte Sekundäreffekte der hnRNP H-Hemmung verantwortlich sein.

Die Validierung der Genexpressionsanalyse erfolgte mittels quantitativer RT-PCR für ausgewählte Gene über einen Zeitraum von fünf Tagen nach Hemmung von hnRNP H. Falls laut Literatur oder Datenbankeinträgen (NCBI, Celera Discovery System, etc.) bekannt war, dass von einer mRNA unterschiedliche Isoformen durch alternatives Spleißen vorkommen, wurden quantitative RT-PCRs etabliert, die „normal“ und alternativ gespleißte Isoformen einer mRNA erfassen können.

Einige identifizierte Zielgene von hnRNP H spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des programmierten Zelltods und fügen sich somit in die bislang erworbenen Erkenntnisse über die mögliche Funktion von hnRNP H nahtlos ein:

AKT1 wird durch die PI3-Kinase aktiviert, übt u. a. einen direkten Effekt auf die Apoptose-Maschinerie (Phosphorylierung von BAD) aus und beeinflusst die Aktivität von p53 (Downward, 2004). Die Aktivierung der Kinase-Aktivität von AKT1 schützt eine Vielzahl von Zelltypen vor dem programmierten Zelltod. Daher ist AKT1 in einer Vielzahl von Tumoren konstitutiv aktiviert (Green and Evan, 2002). Eine verringerte Expression von AKT1, wie sie nach einer Hemmung von hnRNP H zu beobachten war, ist mit einer Induktion der Apoptose assoziiert (Green and Evan, 2002).

Bcl-X und BOK gehören zur Familie der Bcl-2-Proteine, welche maßgeblich an der Regulation der Apoptose beteiligt sind (Chao and Korsmeyer, 1998). Bcl-2 Proteine gehören zu den stärksten Regulatoren der Apoptose. Von mehr als 20 Proteinen der Familie ist bekannt, dass durch alternatives Spleißen zwei oder mehr mRNA-Isoformen gebildet werden, die wiederum für anti- bzw. pro-apoptotische Proteine kodieren (Akgul *et al.*, 2004; Schwerk and Schulze-Osthoff, 2005). Auf diese Weise werden zwei Isoformen Bcl-X_L und Bcl-X_S aus der Bcl-X prä-mRNA gebildet (Boise *et al.*, 1993). Die Expression der langen Isoform Bcl-X_L ist u.a. mit einer verminderten Apoptoserate in Tumorzellen und einem erhöhten Metastasenrisiko assoziiert. Bcl-X_S hingegen wirkt pro-apoptotisch (Clarke *et al.*, 1995; Olopade *et al.*, 1997). Das Verhältnis beider Isoformen ist ausschlaggebend dafür, ob Zellen proliferieren oder apoptotisch werden. Nach der Hemmung von hnRNP H zeigte sich eine Reduktion des Verhältnisses von Bcl-X_L zu Bcl-X_S an Tag 3, während die Kontrollgruppe ein stabiles Verhältnis aufwies. Die Reduktion der Bcl-X_L-Expression könnte eine Ursache für den apoptotischen Phänotyp nach hnRNP H-Repression sein. Garneau und Kollegen konnten parallel zu diesen Arbeiten mittels Minigen-Experimenten zeigen, dass hnRNP H am alternativen Spleißen der Bcl-X prä-mRNA beteiligt ist (Garneau *et al.*, 2005). hnRNP H bindet demnach ein spezifisches Motiv (B2G-Element) der prä-mRNA, welches wiederum die Bildung der Bcl-X_S-Isoform reguliert. Demzufolge wäre eine hohe hnRNP H-Expression mit einer hohen Expression der pro-apoptotischen Form Bcl-X_S assoziiert, was nicht schlüssig ist. Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie Ergebnisse von Honoré und Kollegen zeigten, dass hnRNP H in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert ist (Honore *et al.*, 2004; Rauch *et al.*, 2004) und bekannt ist, dass in Tumoren häufig eine Überexpression der Bcl-X_L-Isoform zu finden ist. Eine hohe hnRNP H-Expression ist also mit einer hohen Expression der anti-apoptotischen Form

Bcl-X_L und nicht mit Bcl-X_S assoziiert. Die Validierung unserer Ergebnisse auf Proteinebene, z. B. mittels Western-Blot gegen die Bcl-X-Isoformen, ist Gegenstand der laufenden Forschung.

Die Kinase ARAF1, ein weiteres potenzielles Zielgen von hnRNP H, ist, neben RAF1 und BRAF, Mitglied der humanen Raf-Proteinfamilie. Raf-Proteine spielen eine zentrale Rolle im klassischen Mitogen-aktivierten Proteinkinase-(MAPK)-Signalweg (Seeger and Krebs, 1995) und besitzen ein transformierendes Potenzial (Kisanuki *et al.*, 2005). Laut NCBI-Datenbank-Eintrag gibt es eine bekannte mRNA-Isoform (Gene ID: 369), die für ein Protein von 606 Aminosäuren (17 Exons) kodiert. Im Celera Discovery System (CDS) wird eine zusätzliche, kürzere mRNA-Isoform geführt, welche für ein hypothetisches Protein von 171 Aminosäuren (3 ursprüngliche Exons) kodiert (hCG29140) und durch alternatives Spleißen entstehen könnte. Demnach werden die Introns 2 und 3 neben den ursprünglichen Exons 1 bis 3 als zusätzliche Exons verwendet. Im Intron 3 befindet sich ein prä-terminales Stopp-Kodon, wodurch sich bei Translation ein verkürztes Protein von 171 Aminosäuren ergibt. Es wurde eine quantitative RT-PCRs etabliert, um die konstitutiv und alternativ gespleißten Isoformen von ARAF1 zu erfassen. Nach der Hemmung von hnRNP H in HeLa-Zellen konnten erstmals beide mRNA-Isoformen nachgewiesen werden. Die Existenz der kurzen mRNA-Variante, bestehend aus den oben erwähnten Elementen, wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die „normal“ gespleißte Isoform von ARAF1 wurde in Folge der hnRNP H-Hemmung reprimiert. Ob das verkürzte Protein tatsächlich *in vivo* existiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht beantwortet werden. Ein Antikörper, der dieses Protein detektiert, ist kommerziell nicht verfügbar. Zudem ist fraglich, ob es zur Translation einer solchen mRNA kommt, da derart gespleißte mRNAs üblicherweise mittels *nonsense-mediated decay* (NMD) in der Zelle abgebaut werden (Conti and Izaurralde, 2005; Maquat, 2004). Dennoch stellte sich die Frage, in welcher Art und Weise eine verminderte ARAF1-Expression mit Apoptose assoziiert ist. Eine solche Assoziation wurde in der Gruppe von Walter Köhler, Glasgow, für Raf1 gezeigt (O'Neill *et al.*, 2004), einem Familienmitglied der Raf-Familie, das eine ca. 80%ige Homologie mit ARAF1 aufweist. Die verminderte Expression von Raf1 mittels siRNA induzierte Apoptose. Es wurde gezeigt, dass Raf1 die Dimerisierung und Phosphorylierung der proapoptotischen Kinase MST-2 verhindert. Bei verminderter Raf1-Expression kann MST-2 weitere pro-apoptotische Kinasen wie Salvador und Lats aktivieren, wodurch der programmierte Zelltod ausgelöst wird (O'Neill *et al.*, 2005). Es stellte sich die Frage, ob ARAF1 aufgrund der starken Homologie zu Raf1 redundant die Funktion von Raf1 einnehmen könnte. Erfor-

derlich für diese Funktion wäre eine Interaktion von ARAF1 und MST2 sowie eine Reduktion der Kinaseaktivität von MST2. Die Ergebnisse mittels Ko-Immunpräzipitation zeigten, dass ARAF1 und MST2 interagieren. Erste Daten in Zusammenarbeit mit Eric O'Neill und Walter Köhler zeigten, dass ARAF1 die Kinaseaktivität von MST2 negativ beeinflusst. Die Validierung dieser Daten ist Gegenstand einer laufenden Kooperationsarbeit.

Welche molekulare Funktion hat hnRNP H und warum findet sich eine Überexpression in verschiedenen Tumorentitäten?

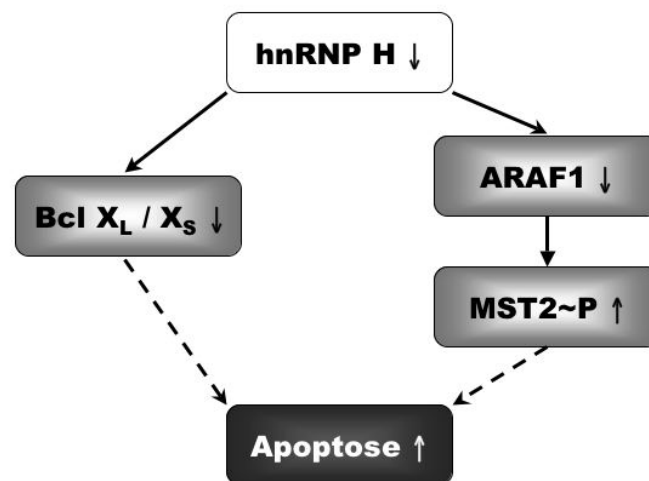


Abbildung 5.1: Hypothetische Zusammenhänge der hnRNP H-Reduktion mit einem apoptotischen Phänotyp. Die Repression der hnRNP H-Expression mittels spezifischer siRNAs führt zu Apoptose in Tumorzelllinien. Eine mögliche Ursache für diesen Phänotyp ist die Verringerung des BclX_L / BclX_S-Verhältnisses aufgrund alternativen Spleißens der prä-mRNA. Daneben bewirkt die Reduktion der hnRNP H-Expression eine verringerte ARAF1-Expression. ARAF1 interagiert mit der pro-apoptotischen Kinase MST2 und reduziert dessen Kinase-Aktivität. Eine verstärkte MST2-Aktivität geht einher mit einem apoptotischen Phänotyp.

Aus den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit läßt sich folgende Hypothese formulieren (Abbildung 5.1): hnRNP H ist nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand am Prozess des alternativen Spleißens von prä-mRNAs beteiligt. Für eine Vielzahl von Genen konnte gezeigt werden, dass in Tumoren, aber auch in anderen Krankheiten (Alzheimer Erkrankung, Myotone Dystropie), spezifische Isoformen exprimiert werden, die aus aberrantem alternativen Spleißen resultieren (Brinkman, 2004; Garcia-Blanco *et al.*, 2004; Kalnina *et al.*, 2005; Venables, 2004). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass hnRNP H am alternativen Spleißen von Genen beteiligt ist, die Schlüsselrollen in der Regulation der Apoptose einnehmen. hnRNP H ist an der Regulation von Bcl-X_L/Bcl-X_S beteiligt (Garneau *et al.*, 2005). Die Hemmung von hnRNP H resultiert in der Verschiebung des Bcl-X_L/Bcl-X_S-Verhältnisses, einer Reduktion der Menge von AKT1 und ARAF1 hin zu einem apoptotischen Phänotyp. Eine hohe Expres-

sion von hnRNP H in Tumorzellen wäre demnach mit einem hohen Bcl-X_L/Bcl-X_S-Verhältnis und einer erhöhten ARAF1-Expression assoziiert, was wiederum zu einer verringerten Apoptoserate führen könnte. Die Möglichkeit von Tumorzellen, „Resistenzen“ gegen Apoptose zu induzieren und ein anti-apoptotisches Milieu zu schaffen, sind bekannte Phänomene von Tumoren (Hanahan and Weinberg, 2000).

Die fortführende Analyse und Identifizierung deregulierter Gene und Proteine aufgrund der hnRNP H-Hemmung soll mittels Proteomanalyse erfolgen. Erste Ergebnisse zeigten, dass sich im Rahmen von 2D-PAGE-Experimenten differenzielle Proteine detektieren lassen. Die Identifizierung dieser Proteine mittels Massenspektrometrie ist Gegenstand derzeitiger Arbeiten.

5.4.3. Modifikationen von hnRNP H

Die Identifizierung und massenspektrometrische Analyse von hnRNP H deuteten darauf hin, dass nur ein N-terminaler Teil des Proteins isoliert wurde. Honoré und Kollegen lieferten erste Hinweise, dass hnRNP H proteolytisch gespalten wird (Honore *et al.*, 1999). Erste Ergebnisse nach Verwendung von HA-fusioniertem hnRNP H und Immunoblot-Analysen sprechen für diese Hypothese. Jedoch wurden zusätzliche Spaltprodukte identifiziert, was darauf hindeutet, dass es möglicherweise eine Vielzahl von Spaltungen gibt und das Protein auch anderweitig, z. B. durch Phosphorylierungen, modifiziert ist (Navakauskiene *et al.*, 2004). Hinweise oder Konsensus-Sequenzen für beteiligte Proteasen bzw. Kinasen sind *bis dato* nicht bekannt. Bei unseren Experimenten ist eine unspezifische Degradation des Proteins nicht auszuschließen, obwohl Protease-Inhibitoren verwendet wurden. Zudem besteht die Gefahr, dass die Überexpression der HA-Fusionskonstrukte Artefakte erzeugte. Zur Zeit können ausschließlich potenzielle C-terminale Spaltprodukte des endogenen Proteins visualisiert werden. Ein Antikörper, der Epitope im Bereich des N-Terminus des Proteins erkennt, ist nicht verfügbar. Die detaillierte Analyse post-translationaler Modifikationen von hnRNP H sowie die subzelluläre Lokalisation potenzieller Spaltprodukte von hnRNP H sind Gegenstand eines laufenden Projektes.

5.5. Ist hnRNP H ein geeigneter Tumormarker oder eine Zielstruktur für Therapien?

Zu Beginn der Arbeit wurde postuliert, dass mit der neu etablierten allo-AMIDA-Strategie valide Tumorantigene identifiziert werden können.

Ist hnRNP H ein geeigneter Tumormarker oder gar eine geeignete Zielstruktur von Krebstherapien?

hnRNP H weist eine starke Überexpression in einigen Primärtumoren diverser Entitäten und Lymphknotenmetastasen auf. In allen untersuchten Proben des Hals-Rachen-Bereiches war diese starke Expression stets auf die Tumorzellen beschränkt. Dies und insbesondere die starke Expression in Metastasen macht hnRNP H zu einem potenten Marker für die Bestimmung von disseminierten okkulten Tumorzellen. Interessanterweise war im Vergleich zu gesundem Epithel bereits in hyperplastischen Epithelien eine deutlich erhöhte hnRNP H-Expression zu beobachten, die mit fortschreitender Karzinogenese zunahm. Diese Überexpression in frühen Tumorstadien ist von Bedeutung für die Frühdiagnose entstehender Karzinome und Rezidive. Erste Ergebnisse weiterführender Analysen zeigen, dass Leukoplakien als Vorstufe von Karzinomen ebenfalls eine verstärkte Expression von hnRNP H aufweisen (Daten nicht gezeigt). Beim klinischen Auftreten einer Leukoplakie besteht, abhängig von der histologisch erkennbaren Hyperplasie oder dem Dysplasiegrad, häufig ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines bösartigen Tumors (Lodi *et al.*, 2004). hnRNP H könnte als Marker zur Früherkennung und Beurteilung von Leukoplakien dienen.

Bei malignen Erkrankungen bestehen unterschiedliche Möglichkeiten der Therapie. Eine Möglichkeit stellt die Immuntherapie dar, wobei prinzipiell mehrere Ansätze existieren: Die Applikation monoklonaler Antikörper, die Vakzinierung mit Peptiden oder Proteinen, der Einsatz zytotoxischer T-Zellen und APCs. Essentiell für die sog. spezifische adoptive Immuntherapie sind tumorspezifische Antigene als Zielstrukturen, wobei diese Therapie Antikörper- oder Zell-vermittelt erfolgen kann. Eine Therapie mittels monoklonaler Antikörper ist im Fall von hnRNP H nicht geeignet, da diese nur bei spezifischer Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen anwendbar ist. Die adoptive Immuntherapie mit T-Zellen umfasst prinzipiell die Stimulation von tumorinfiltrierenden (TIL) oder zytotoxischen CD8⁺-Lymphozyten, die Peptide von Tumorantigenen spezifisch erkennen. Diese Peptide werden von den Tumorzellen über MHC-I (major histocompatibility complex)- Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert und unterscheiden somit Tumorzellen von gesunden Zellen. Wird ein Tumorpatient mit TAs oder immunogenen Peptiden des Antigens immunisiert, kann dies zu einer verstärkten Stimulation spezifischer T-Lymphozyten *in vivo* führen. Alternativ können antigenspezifische T-Zellen *in vitro* aktiviert, expandiert und dem Patienten reinfundiert werden. Voraussetzung für diese Therapieform wäre also die Präsentation von Peptiden des Tumorantigens auf MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche von Tumorzellen. Ob Peptide

von hnRNP H auf der Oberfläche von Tumoren präsentiert werden, ist *bis dato* nicht untersucht.

Neben den beschriebenen Immuntherapien sind auch andere Strategien denkbar.

Die Repression von hnRNP H *in vitro* mittels RNAi resultierte in der Apoptose von Tumorzelllinien. RNAi wird derzeit als valide Strategie gehandelt, *in vivo* als „Antisense-Therapie“ klinische Anwendung zu finden (Gleave and Monia, 2005). SiRNAs bzw. Antisense-Moleküle wurden so modifiziert, dass eine längere Halbwertszeit und eine geeignete Aufnahme in die Zelle garantiert werden. Einige mögliche Zielmoleküle dieser Therapie, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind u. a. Bcl-X_L (Leech *et al.*, 2000), Hsp27 (Gleave and Monia, 2005) und Raf (Stevenson *et al.*, 1999). Eine Repression dieser Moleküle sollte durch die Induktion von Apoptose *in vivo* zu einem Rückgang der Tumormasse führen. Die therapeutische Anwendung einiger Antisense-Moleküle wird derzeit in präklinischen und ersten klinischen Phasen getestet (Gleave and Monia, 2005). Es stellt sich die Frage, ob hnRNP H ein geeignetes Zielprotein einer Antisensetherapie wäre. Wichtigste Voraussetzung wäre ein möglichst großer Unterschied zwischen der Expression in malignen Geweben und gesundem Gewebe, um Nebenwirkungen für die Patienten niedrig zu halten. Unsere Arbeiten und Ergebnisse von Honoré und Kollegen zeigen, dass hnRNP H in Tumorzellen und Metastasen im Vergleich zu gesundem Gewebe sehr stark exprimiert ist, so dass hnRNP H durchaus eine geeignete Zielstruktur im Rahmen einer Antisense-Therapie darstellen könnte.

5.6. Ausblick

Allo-AMIDA

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Tumorantigene für maligne Erkrankungen des Hals-Rachen-Bereiches, da hier wenige Marker bekannt sind. Dazu wurde eine allogene Variante der AMIDA-Technologie entwickelt, mit der 12 neue potenzielle Antigene identifiziert werden konnten. Die intensive Validierung weiterer allo-AMIDA-Antigene ist Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten in unserem Labor. Vor allem die klinische Validierung der identifizierten Tumor-assoziierten Proteine hinsichtlich ihres diagnostischen Wertes und ihres Potenziales zur Früherkennung von malignen Erkrankungen sind Ziele folgender Arbeiten. Des Weiteren werden die Antigene funktionell charakterisiert, um auf diese Weise die Grundlage für eine therapeutische Hemmung dieser Moleküle zu erreichen. Ebenso wird das Potenzial zirkulierender Serum-Antikörper gegen die AMIDA-Antigene als Biomarker zur Früherkennung studiert.

Aufgrund der technischen Änderungen bei allo-AMIDA wäre eine Anwendung auf andere Tumorentitäten, die mit einer schlechten Prognose und wenigen Markern assoziiert sind, denkbar (z. B. Pankreas-Karzinom). Voraussetzungen wären Seren von Tumorpatienten und eine geeignete Zelllinie der Tumorentität.

Eine mögliche technische Weiterentwicklung von AMIDA ist die Verwendung von DIGE-Gelen (differential gel electrophoresis) anstelle der Silberfärbung der 2D-Gele (Tonge *et al.*, 2001), um technisch bedingte Unterschiede zwischen 2D-Gelen zu umgehen. DIGE-Farbstoffe besitzen zudem eine höhere Sensitivität als die herkömmliche Silberfärbung.

Membranproteine mit extrazellulären Epitopen stellen interessante Zielstrukturen für die adoptive Immuntherapie mittels monoklonalen Antikörpern dar. Technisch bedingt lassen sich Membranproteine mit mehreren Transmembrandomänen und andere sehr hydrophobe Proteine mittels 2D-Elektrophorese schlecht bzw. nicht auftrennen. Daher ist es erstrebenswert, allo-AMIDA dahingehend zu optimieren. Denkbar wäre die IP von TAs aus Membranfraktionen von Tumorzelllinien mit Serumantikörpern und die nachfolgende Auftrennung der Antigene mittels HPLC. Einzelne HPLC-Fractionen könnten anschließend in einem eindimensionalen Gel aufgetrennt und visualisiert werden.

Funktionelle Charakterisierung von hnRNP H

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das allo-AMIDA-Antigen hnRNP H in Tumoren und Metastasen stark überexprimiert ist. Die Inhibierung der hnRNP H-Expression in Tumorzelllinien führte zum apoptotischen Zelltod. Mittels Genexpressionsanalyse konnten einige mRNAs (Bcl-X, ARAF1) detektiert werden, die von hnRNP H durch alternatives Spleißen reguliert werden. Die detaillierte Untersuchung dieser Regulation ist ein weiterführendes Experiment. So muss zunächst geklärt werden, ob es tatsächlich zur notwendigen Interaktion zwischen hnRNP H und den identifizierten mRNAs kommt. Als mögliche Technik kommt die „CLIP-Strategie“ (cross-linking and immunprecipitation) in Frage, bei der, nach Crosslink von Proteinen mit den gebundenen Nukleinsäuren, der Protein-mRNA-Komplex mittels spezifischer Antikörper aus den Zellen isoliert wird (Ule *et al.*, 2005). Die gebundene mRNA kann anschließend mittels RT-PCR analysiert werden. Zur detaillierten Analyse alternativ gespleißter Gene stehen eine Vielzahl von Techniken und Strategien zur Verfügung (Garcia-Blanco, 2005). Geeignete Methoden sind Minigene-Systeme zur *in vitro* Analyse des Spleißvorganges (Cooper, 2005) oder der Einsatz von „Tiling-Arrays“, welche die Detektion und Quantifizierung alternativ gespleißter mRNAs mittels spleißsensitiver Microarrays ermöglichen (Srinivasan *et al.*, 2005).

Welche Auswirkungen die Repression von hnRNP H auf Proteinebene hat, soll mit Hilfe der 2D-Elektrophorese analysiert werden. Die Analyse und Identifizierung differenzieller Proteine mittels Massenspektrometrie ist Gegenstand derzeitiger Arbeiten.

Es wird diskutiert, dass alternatives Spleißen einen streng regulierten Prozess darstellt, an dem – ähnlich dem konventionellen Spleißvorgang – eine Vielzahl von Proteinen und Regulatoren beteiligt sind. Es stellt sich also die Frage, ob neben dem bereits identifizierten Interaktionspartner hnRNP F (Chou *et al.*, 1999) weitere Proteine mit hnRNP H interagieren. Eine geeignete Methode zur Identifizierung von Interaktionspartnern ist die Ko-Immunopräzipitation, bei der hnRNP H und mögliche interagierende Proteine als Proteinkomplex isoliert werden können. Die Auftrennung der Proteinkomplexe erfolgt anschließend durch Gelelektrophorese, die Identifizierung potenzieller Interaktionspartner über Massenspektrometrie.

Modifikationen von hnRNP H

Neben den postulierten posttranslationalen Spaltungen von hnRNP H sollen weitere potenzielle Modifizierungen des Proteins wie Phosphorylierungen detaillierter analysiert werden.

Spaltprodukte von hnRNP H sollen auf ihre subzelluläre Lokalisation mittels immunhistochemischer Experimente mit einem spezifischen Antikörper gegen die HA-Fusionsproteine analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Fusionierung fluoreszierender Proteine wie des Green Fluorescent Proteins (GFP) anstelle der verwendeten HA-Fusionen.

6. Zusammenfassung

Maligne Erkrankungen sind in den Industrieländern, nach Herz-Kreislaufkrankungen, die zweithäufigste Todesursache. Aufgrund der Erfolge bei der Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird Schätzungen zufolge Krebs in den nächsten Jahren die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern sein. Trotz des klinischen und wissenschaftlichen Fortschritts ist die Prognose der meisten Tumorentitäten unverändert schlecht. Eine der Hauptursachen ist der Mangel an spezifischen Markern, um eine geeignete Frühdiagnostik, Vorsorge und Therapie zu ermöglichen. Biomarker, wie tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene, werden als potente Strukturen diskutiert, Karzinome bereits im Frühstadium zu diagnostizieren und im Rahmen von Therapien als Zielstrukturen eingesetzt zu werden. Seit einigen Jahren werden daher systematische Techniken zur Identifizierung neuer Tumorantigene entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine bestehende Technologie zur Identifizierung von Tumorantigenen weiterentwickelt und optimiert werden. Die in der Arbeitsgruppe etablierte Technik namens AMIDA (Autoantibody-mediated Identification of Antigens) basiert auf der spezifischen Autoantikörper-vermittelten Selektion und Aufreinigung potenzieller Tumorantigene und deren anschließender zweidimensionaler Auftrennung und Isolierung. AMIDA ermöglicht prinzipiell die Identifizierung von Tumorantigenen, die durch posttranslationale Modifikationen immunogen wurden, wobei für die Isolierung das komplette Proteom zur Verfügung steht. Es wurde eine allogene Variante etabliert, welche die Technik unabhängig von autologen Tumorbiospien macht (allo-AMIDA). Neben der Einführung geeigneter Kontrollen kann allo-AMIDA nun im präparativen Maßstab durchgeführt werden. Der Vorteil von allo-AMIDA gegenüber AMIDA und anderen Strategien ist, neben der schnellen und reproduzierbaren Durchführung, die nunmehr universelle Einsetzbarkeit der Methode. Zur Identifizierung von Tumorantigenen werden lediglich Seren von Tumorpatienten und eine geeignete Tumorzelllinie benötigt.

Allo-AMIDA wurde am Beispiel von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches eingesetzt und führte zur Identifizierung von insgesamt 12 potenziellen Tumorantigenen. Neun der 12 Tumorantigene wiesen zum Zeitpunkt der Identifizierung eine Assoziation mit Tumoren auf, fünf davon sind etablierte Tumorantigene, was die Eignung von allo-AMIDA zur Identifizierung von TAs beweist. Für die allo-AMIDA-Antigene Grb-2 und Hsp-27 konnte eine starke Expression in Tumorzellen der Kopf-Hals-Entität gezeigt werden.

Drei der allo-AMIDA Antigene waren bis zum Zeitpunkt ihrer Identifizierung nicht mit malignen Erkrankungen assoziiert. Eines dieser Proteine – hnRNP H (heterogeneous ribonucleoprotein H) – stellte sich als geeigneter Marker für Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches heraus. Es konnte auf Transkript- und Proteinebene gezeigt werden, dass hnRNP H bereits in hyperplastischem Epithelien vermehrt gebildet wird und mit zunehmender Karzinogenese in den meisten primären Tumoren bzw. Metastasen dieser Tumorentität stark überexprimiert ist. Interessanterweise war diese starke Expression auf Tumorzellen beschränkt. In anderen Tumorentitäten (Kolon-, Pankreas-, Mamma-Karzinom) war hnRNP H ebenfalls stark überexprimiert, die Expression in humanen nicht-malignen Geweben war sehr heterogen. Da *bis dato* wenige Informationen über die Funktion dieses nukleären Proteins bekannt sind, wurde hnRNP H detaillierter analysiert. In der Literatur wird diskutiert, dass hnRNP H am alternativen Spleißen von prä-mRNAs bzw. an der Regulation dieses Prozesses beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Repression von hnRNP H durch RNAi zur Apoptose von Tumorzelllinien führt. Mittels Genexpressionanalyse konnten potenzielle Zielgene im Bereich Apoptose identifiziert werden, die von hnRNP H durch alternatives Spleißen reguliert werden. hnRNP H ist an der Regulation des Bcl-X-Gens beteiligt, was von Garneau und Kollegen (2005) kürzlich ebenfalls gezeigt werden konnte. Die Regulation von ARAF1 durch hnRNP H wurde erstmals gezeigt; ein potenzieller Weg, wie die Deregulation von ARAF1 Apoptose induzieren kann, wird vorgeschlagen. Die Validierung der Zielgene von hnRNP H im Kontext von Tumorzellen ist Gegenstand laufender Projekte und weiterer Analysen.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, G.P. and Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, **23**, 1147-1157.
- Adamson, J., Morgan, E.A., Beesley, C., Mei, Y., Foster, C.S., Fujii, H., Rudland, P.S., Smith, P.H. and Ke, Y. (2003) High-level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenicity. *Oncogene*, **22**, 2739-2749.
- Akgul, C., Moulding, D.A. and Edwards, S.W. (2004) Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2189-2199.
- Armstrong, A. and Eck, S.L. (2003) EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther*, **2**, 320-326.
- Balkwill, F. (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, **4**, 540-550.
- Berke, Z., Andersen, M.H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J. and Haurum, J.S. (2000) Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules. *Leukemia*, **14**, 419-426.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.
- Boutayeb, A. (2005) The double burden of communicable and non-communicable diseases in developing countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
- Boyle, J.O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R.H., Roa, R.A., Correo, R., Eby, Y.J., Ruppert, J.M. and Sidransky, D. (1993) The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*, **53**, 4477-4480.
- Boyle, P., Macfarlane, G.J., Blot, W.J., Chiesa, F., Lefebvre, J.L., Azul, A.M., de Vries, N. and Scully, C. (1995) European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programme: oral carcinogenesis in Europe. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, **31B**, 75-85.
- Braakhuis, B.J., Snijders, P.J., Keune, W.J., Meijer, C.J., Ruijter-Schippers, H.J., Leemans, C.R. and Brakenhoff, R.H. (2004) Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 998-1006.
- Brennan, J.A., Boyle, J.O., Koch, W.M., Goodman, S.N., Hruban, R.H., Eby, Y.J., Couch, M.J., Forastiere, A.A. and Sidransky, D. (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, **332**, 712-717.
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. and Boon, T. (1993) The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med*, **178**, 489-495.
- Brichory, F.M., Misek, D.E., Yim, A.M., Krause, M.C., Giordano, T.J., Beer, D.G. and Hanash, S.M. (2001) An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9824-9829.
- Brinkman, B.M. (2004) Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem*, **37**, 584-594.
- Caporali, R., Bugatti, S., Bruschi, E., Cavagna, L. and Montecucco, C. (2005) Autoantibodies to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Autoimmunity*, **38**, 25-32.

- Caputi, M. and Zahler, A.M. (2001) Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *J Biol Chem*, **276**, 43850-43859.
- Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*, **16**, 395-419.
- Chen, C.D., Kobayashi, R. and Helfman, D.M. (1999) Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev*, **13**, 593-606.
- Chen, H., Hu, B., Gacad, M.A. and Adams, J.S. (1998) Cloning and expression of a novel dominant-negative-acting estrogen response element-binding protein in the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein family. *J Biol Chem*, **273**, 31352-31357.
- Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A.O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M. and Old, L.J. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1914-1918.
- Chou, M.Y., Rooke, N., Turck, C.W. and Black, D.L. (1999) hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol Cell Biol*, **19**, 69-77.
- Clarke, M.F., Apel, I.J., Benedict, M.A., Eipers, P.G., Sumantran, V., Gonzalez-Garcia, M., Doedens, M., Fukunaga, N., Davidson, B., Dick, J.E., Minn, A.J., Boise, L.H., Thompson, C.B., Wicha, M. and Nunez, G. (1995) A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11024-11028.
- Conroy, S.E., Sasieni, P.D., Amin, V., Wang, D.Y., Smith, P., Fentiman, I.S. and Latchman, D.S. (1998) Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, **77**, 1875-1879.
- Conti, E. and Izaurralde, E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 316-325.
- Cooper, T.A. (2005) Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods*, **37**, 331-340.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J.P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P. and Boon, T. (1988) Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2274-2278.
- de Villiers, E.M., Weidauer, H., Otto, H. and zur Hausen, H. (1985) Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*, **36**, 575-578.
- Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B. and *et al.* (1994) Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res*, **54**, 16-20.
- Disis, M.L. and Cheever, M.A. (1996) Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **8**, 637-642.
- Downward, J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 177-182.
- Durak, I., Cetin, R., Canbolat, O., Cetin, D., Yurtarslani, Z. and Unal, A. (1994) Adenosine deaminase, 5'-nucleotidase, guanase and cytidine deaminase activities in gastric tissues from patients with gastric cancer. *Cancer Lett*, **84**, 199-202.
- Enepekides, D.J., Sultanem, K., Nguyen, C., Shenouda, G., Black, M.J. and Rochon, L. (1999) Occult cervical metastases: immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **120**, 713-717.
- Falk, K., Rotzschke, O., Deres, K., Metzger, J., Jung, G. and Rammensee, H.G. (1991) Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infec-

- ted cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J Exp Med*, **174**, 425-434.
- Fernandez Madrid, F. (2005) Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett*, **230**, 187-198.
- Fernandez Madrid, F., Karvonen, R.L., Ensley, J., Kraut, M., Granda, J.L., Alansari, H., Tang, N. and Tomkiel, J.E. (2005) Spectra of antinuclear antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the lung and of the head and neck. *Cancer Detect Prev*, **29**, 59-65.
- Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*, **14**, 327-339.
- Fung, L.F., Lo, A.K., Yuen, P.W., Liu, Y., Wang, X.H. and Tsao, S.W. (2000) Differential gene expression in nasopharyngeal carcinoma cells. *Life Sci*, **67**, 923-936.
- Garcia-Blanco, M.A. (2005) Methods for the study of alternative splicing. *Methods*, **37**, 289-291.
- Garcia-Blanco, M.A., Baraniak, A.P. and Lasda, E.L. (2004) Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol*, **22**, 535-546.
- Garneau, D., Revil, T., Fiset, J.F. and Chabot, B. (2005) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F/H proteins modulate the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem*, **280**, 22641-22650.
- Gath, H.J. and Brakenhoff, R.H. (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **18**, 109-126.
- Gieseg, M.A., Man, M.Z., Gorski, N.A., Madore, S.J., Kaldjian, E.P. and Leopold, W.R. (2004) The influence of tumor size and environment on gene expression in commonly used human tumor lines. *BMC Cancer*, **4**, 35.
- Gires, O., Munz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W. and Zeidler, R. (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1198-1207.
- Gleave, M.E. and Monia, B.P. (2005) Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 468-479.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B. and Vinuesa, C.G. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, **435**, 590-597.
- Gouble, A., Grazide, S., Meggetto, F., Mercier, P., Delsol, G. and Morello, D. (2002) A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res*, **62**, 1489-1495.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Grandis, J.R. and Tweardy, D.J. (1993) TGF- α and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl*, **17F**, 188-191.
- Green, D.R. and Evan, G.I. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**, 19-30.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.
- Hamasaki, M., Kamma, H., Wu, W., Kaneko, S., Fujiwara, M., Satoh, H., Haraoka, S., Kikuchi, M. and Shirakusa, T. (2001) Expression of hnRNP B1 in four major histological types of lung cancers. *Anticancer Res*, **21**, 979-984.
- Hanada, K., Yewdell, J.W. and Yang, J.C. (2004) Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*, **427**, 252-256.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for Transformation of E.coli. *IRL Press, Oxford*.

- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- He, Q.Y., Chen, J., Kung, H.F., Yuen, A.P. and Chiu, J.F. (2004) Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, **4**, 271-278.
- Hecht, S.S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 733-744.
- Hildesheim, A. and Levine, P.H. (1993) Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev*, **15**, 466-485.
- Hippo, Y., Yashiro, M., Ishii, M., Taniguchi, H., Tsutsumi, S., Hirakawa, K., Kodama, T. and Aburatani, H. (2001) Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res*, **61**, 889-895.
- Honore, B., Baandrup, U. and Vorum, H. (2004) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. *Exp Cell Res*, **294**, 199-209.
- Honore, B., Rasmussen, H.H., Vorum, H., Dejgaard, K., Liu, X., Gromov, P., Madsen, P., Gesser, B., Tommerup, N. and Celis, J.E. (1995) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *J Biol Chem*, **270**, 28780-28789.
- Honore, B., Vorum, H. and Baandrup, U. (1999) hnRNPs H, H' and F behave differently with respect to posttranslational cleavage and subcellular localization. *FEBS Lett*, **456**, 274-280.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am J Clin Pathol*, **75**, 816-821.
- Huang, J.S., Chao, C.C., Su, T.L., Yeh, S.H., Chen, D.S., Chen, C.T., Chen, P.J. and Jou, Y.S. (2004) Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 950-958.
- Hunter, K.D., Parkinson, E.K. and Harrison, P.R. (2005) Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 127-135.
- Hynes, N.E. and Stern, D.F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 165-184.
- Iervolino, A., Santilli, G., Trotta, R., Guerzoni, C., Cesi, V., Bergamaschi, A., Gambacorti-Passerini, C., Calabretta, B. and Perrotti, D. (2002) hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *Mol Cell Biol*, **22**, 2255-2266.
- Kairouz, R. and Daly, R.J. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer: modulation of tyrosine kinase signalling in human breast cancer through altered expression of signalling intermediates. *Breast Cancer Res*, **2**, 197-202.
- Kalnina, Z., Zayakin, P., Silina, K. and Line, A. (2005) Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **42**, 342-357.
- Kameshita, I. and Fujisawa, H. (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal Biochem*, **183**, 139-143.
- Kapranos, N., Kominea, A., Konstantinopoulos, P.A., Savva, S., Artelaris, S., Vondoros, G., Sotiropoulou-Bonikou, G. and Papavassiliou, A.G. (2002) Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol*, **128**, 426-432.
- Kastenbauer, E. and Wollenberg, B. (1999) [In search of new treatment methods for head-neck carcinoma]. *Laryngorhinootologie*, **78**, 31-35.

- Kawakami, Y., Fujita, T., Matsuzaki, Y., Sakurai, T., Tsukamoto, M., Toda, M. and Sumimoto, H. (2004) Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci*, **95**, 784-791.
- Kellner, R., Lichtenfels, R., Atkins, D., Bukur, J., Ackermann, A., Beck, J., Brenner, W., Melchior, S. and Seliger, B. (2002) Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics*, **2**, 1743-1751.
- Kisanuki, H., Choi, Y.L., Wada, T., Moriuchi, R., Fujiwara, S., Kaneda, R., Koinuma, K., Ishikawa, M., Takada, S., Yamashita, Y. and Mano, H. (2005) Retroviral expression screening of oncogenes in pancreatic ductal carcinoma. *Eur J Cancer*, **41**, 2170-2175.
- Klade, C.S., Voss, T., Krystek, E., Ahorn, H., Zatloukal, K., Pummer, K. and Adolf, G.R. (2001) Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics*, **1**, 890-898.
- Klussmann, J.P., Weissenborn, S. and Fuchs, P.G. (2001) Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, **345**, 376; author reply 377.
- Kopan, R. and Goate, A. (2002) Aph-2/Nicastrin: an essential component of gamma-secretase and regulator of Notch signaling and Presenilin localization. *Neuron*, **33**, 321-324.
- Krecic, A.M. and Swanson, M.S. (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 363-371.
- Kumari, T.V., Vasudevan, D.M., Ankathil, R., Ramani, P. and Vijayakumar, T. (1987) Demonstration of HSV-I antigen in patients with oral cancer by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *J Exp Pathol*, **3**, 75-86.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagarkova, M.A., Boitchenko, V.E., Mescheryakov, A.A., Kashkarova, U.A. and Nedospasov, S.A. (2000) Human cortactin as putative cancer antigen. *Oncogene*, **19**, 5204-5207.
- Lambot, M.A., Peny, M.O., Fayt, I., Haot, J. and Noel, J.C. (2000) Overexpression of 27-kDa heat shock protein relates to poor histological differentiation in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Histopathology*, **36**, 326-330.
- Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzer, K., Sautier, W., Chucholowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer, E. and Holzel, D. (2002) [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie*, **81**, 499-508.
- Le Naour, F. (2001) Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics*, **1**, 1295-1302.
- Leech, S.H., Olie, R.A., Gautschi, O., Simoes-Wust, A.P., Tschopp, S., Haner, R., Hall, J., Stahel, R.A. and Zangemeister-Wittke, U. (2000) Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *Int J Cancer*, **86**, 570-576.
- Leonardi, R., Pannone, G., Magro, G., Kudo, Y., Takata, T. and Lo Muzio, L. (2002) Differential expression of heat shock protein 27 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, **9**, 261-266.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-331.
- Lichtenfels, R., Kellner, R., Bukur, J., Beck, J., Brenner, W., Ackermann, A. and Seliger, B. (2002) Heat shock protein expression and anti-heat shock protein reactivity in renal cell carcinoma. *Proteomics*, **2**, 561-570.
- Liggett, W.H., Jr. and Sidransky, D. (1998) Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, **16**, 1197-1206.
- Lin, J.L., Geng, X., Bhattacharya, S.D., Yu, J.R., Reiter, R.S., Sastri, B., Glazier, K.D., Mirza, Z.K., Wang, K.K., Amenta, P.S., Das, K.M. and Lin, J.J. (2002) Isolation and sequen-

- cing of a novel tropomyosin isoform preferentially associated with colon cancer. *Gastroenterology*, **123**, 152-162.
- Litvinov, S.V., van Driel, W., van Rhijn, C.M., Bakker, H.A., van Krieken, H., Fleuren, G.J. and Warnaar, S.O. (1996) Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol*, **148**, 865-875.
- Lodi, G., Sardella, A., Bez, C., Demarosi, F. and Carrassi, A. (2004) Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001829.
- Lueking, A., Possling, A., Huber, O., Beveridge, A., Horn, M., Eickhoff, H., Schuchardt, J., Lehrach, H. and Cahill, D.J. (2003) A nonredundant human protein chip for antibody screening and serum profiling. *Mol Cell Proteomics*, **2**, 1342-1349.
- Mahe, D., Mahl, P., Gattoni, R., Fischer, N., Mattei, M.G., Stevenin, J. and Fuchs, J.P. (1997) Cloning of human 2H9 heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. Relation with splicing and early heat shock-induced splicing arrest. *J Biol Chem*, **272**, 1827-1836.
- Mamula, M.J., Gee, R.J., Elliott, J.I., Sette, A., Southwood, S., Jones, P.J. and Blier, P.R. (1999) Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J Biol Chem*, **274**, 22321-22327.
- Mandal, M., Vadlamudi, R., Nguyen, D., Wang, R.A., Costa, L., Bagheri-Yarmand, R., Mendelsohn, J. and Kumar, R. (2001) Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. *J Biol Chem*, **276**, 9699-9704.
- Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M. and Eisenbach, L. (1994) CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature*, **369**, 67-71.
- Mandrizzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. and van der Bruggen, P. (1997) A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med*, **186**, 785-793.
- Maniatis, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press, New York*.
- Maquat, L.E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 89-99.
- Matlin, A.J., Clark, F. and Smith, C.W. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 386-398.
- Matunis, M.J., Xing, J. and Dreyfuss, G. (1994) The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1059-1067.
- Mayer, A., Andratschke, M., Pauli, C., Graefe, H., Kristina, K. and Wollenberg, B. (2005) Generation of an autologous cell system for immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*, **25**, 4075-4080.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.
- Mills, K.I., Walsh, V., Gilkes, A.F., Sweeney, M.C., Mirza, T., Woodgate, L.J., Brown, G. and Burnett, A.K. (2000) High FUS/TLS expression in acute myeloid leukaemia samples. *Br J Haematol*, **108**, 316-321.
- Mintz, P.J., Kim, J., Do, K.A., Wang, X., Zinner, R.G., Cristofanilli, M., Arap, M.A., Hong, W.K., Troncoso, P., Logothetis, C.J., Pasqualini, R. and Arap, W. (2003) Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol*, **21**, 57-63.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

- Moutsopoulos, N.M., Routsias, J.G., Vlachoyiannopoulos, P.G., Tzioufas, A.G. and Moutsopoulos, H.M. (2000) B-cell epitopes of intracellular autoantigens: myth and reality. *Mol Med*, **6**, 141-151.
- Navakauskiene, R., Treigyte, G., Gineitis, A. and Magnusson, K.E. (2004) Identification of apoptotic tyrosine-phosphorylated proteins after etoposide or retinoic acid treatment. *Proteomics*, **4**, 1029-1041.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M. and Kolch, W. (2004) Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science*, **306**, 2267-2270.
- O'Neill, E.E., Matallanas, D. and Kolch, W. (2005) Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway. *Cancer Res*, **65**, 5485-5487.
- Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B. and Recant, W.M. (1997) Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am*, **3**, 230-237.
- Ostergaard, M., Rasmussen, H.H., Nielsen, H.V., Vorum, H., Orntoft, T.F., Wolf, H. and Celis, J.E. (1997) Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation. *Cancer Res*, **57**, 4111-4117.
- Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R. and Chabot, B. (2003) Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticle A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res*, **63**, 7679-7688.
- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., Lang, S., Zeidler, R. and Gires, O. (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett*, **193**, 25-32.
- Perrotti, D., Bonatti, S., Trotta, R., Martinez, R., Skorski, T., Salomoni, P., Grassilli, E., Lozzo, R.V., Cooper, D.R. and Calabretta, B. (1998) TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Embo J*, **17**, 4442-4455.
- Perrotti, D., Cesi, V., Trotta, R., Guerzoni, C., Santilli, G., Campbell, K., Iervolino, A., Condorelli, F., Gambacorti-Passerini, C., Caligiuri, M.A. and Calabretta, B. (2002) BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet*, **30**, 48-58.
- Poschl, G. and Seitz, H.K. (2004) Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*, **39**, 155-165.
- Prasanna, L., Misek, D.E., Hinderer, R., Michon, J., Geiger, J.D. and Hanash, S.M. (2000) Identification of beta-tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, **6**, 3949-3956.
- Quon, H., Liu, F.F. and Cummings, B.J. (2001) Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*, **23**, 147-159.
- Rauch, J., Ahlemann, M., Schaffrik, M., Mack, B., Ertongur, S., Andratschke, M., Zeidler, R., Lang, S. and Gires, O. (2004) Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 156-162.
- Ressing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J. and Kast, W.M. (1995) Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol*, **154**, 5934-5943.
- Rinaldo, A., Devaney, K.O. and Ferlito, A. (2004) Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, **66**, 38-41.

- Ringstrom, E., Peters, E., Hasegawa, M., Posner, M., Liu, M. and Kelsey, K.T. (2002) Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, **8**, 3187-3192.
- Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Fitzgerald, E.B., Kawakami, Y. and Rosenberg, S.A. (1997) The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*, **159**, 303-308.
- Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Levi, F., Talamini, R. and La Vecchia, C. (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, **40**, 207-213.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11810-11813.
- Sartor, M., Steingrimsdottir, H., Elamin, F., Gaken, J., Warnakulasuriya, S., Partridge, M., Thakker, N., Johnson, N.W. and Tavassoli, M. (1999) Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer*, **80**, 79-86.
- Scanlan, M.J., Chen, Y.T., Williamson, B., Gure, A.O., Stockert, E., Gordan, J.D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. and Old, L.J. (1998) Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer*, **76**, 652-658.
- Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F. and Sussan, T. (1992) The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res*, **52**, 6380-6384.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U. and Greaves, M.F. (1982) A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem*, **257**, 10766-10769.
- Schullery, D.S., Ostrowski, J., Denisenko, O.N., Stempka, L., Shnyreva, M., Suzuki, H., Gschwendt, M. and Bomsztyk, K. (1999) Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. *J Biol Chem*, **274**, 15101-15109.
- Schwerk, C. and Schulze-Osthoff, K. (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, **19**, 1-13.
- Scofield, R.H. (2004) Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*, **363**, 1544-1546.
- Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, **9**, 726-735.
- Seitz, H.K., Matsuzaki, S., Yokoyama, A., Homann, N., Vakevainen, S. and Wang, X.D. (2001) Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 137S-143S.
- Seliger, B. and Kellner, R. (2002) Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*, **2**, 1641-1651.
- Shih, S.C. and Claffey, K.P. (1999) Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem*, **274**, 1359-1365.
- Sidransky, D. (2002) Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 210-219.
- Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T. and Old, L.J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 615-625.
- Sinha, P., Hutter, G., Kottgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D. and Lage, H. (1999) Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis*, **20**, 2952-2960.

- Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1997) RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 345-353.
- Spiotto, M.T., Fu, Y.X. and Schreiber, H. (2003) Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. *Curr Opin Immunol*, **15**, 725-730.
- Srinivasan, K., Shiue, L., Hayes, J.D., Centers, R., Fitzwater, S., Loewen, R., Edmondson, L.R., Bryant, J., Smith, M., Rommelfanger, C., Welch, V., Clark, T.A., Sugnet, C.W., Howe, K.J., Mandel-Gutfreund, Y. and Ares, M., Jr. (2005) Detection and measurement of alternative splicing using splicing-sensitive microarrays. *Methods*, **37**, 345-359.
- Stevenson, J.P., Yao, K.S., Gallagher, M., Friedland, D., Mitchell, E.P., Cassella, A., Monia, B., Kwok, T.J., Yu, R., Holmlund, J., Dorr, F.A. and O'Dwyer, P.J. (1999) Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *J Clin Oncol*, **17**, 2227-2236.
- Stinton, L.M., Eystathiou, T., Selak, S., Chan, E.K. and Fritzler, M.J. (2004) Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin Immunol*, **110**, 30-44.
- Sueoka, E., Goto, Y., Sueoka, N., Kai, Y., Kozu, T. and Fujiki, H. (1999) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res*, **59**, 1404-1407.
- Sun, Z.Q., Jiang, B., Zhao, X.S., Bao, L., Wu, T., Lu, X.J., Kong, Y. and Wang, D.B. (2003) [Expression of cytidine deaminase mRNA in bone marrow cells from patients with acute leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, **11**, 246-250.
- Taylor, D., Koch, W.M., Zahurak, M., Shah, K., Sidransky, D. and Westra, W.H. (1999) Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol*, **30**, 1221-1225.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, **1**, 377-396.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A. and Darnell, R.B. (2005) CLIP: A method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*, **37**, 376-386.
- Unwin, R.D., Harnden, P., Pappin, D., Rahman, D., Whelan, P., Craven, R.A., Selby, P.J. and Banks, R.E. (2003) Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma. *Proteomics*, **3**, 45-55.
- Usener, D., Schadendorf, D., Koch, J., Dubel, S. and Eichmüller, S. (2003) cTAGE: a cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J Invest Dermatol*, **121**, 198-206.
- Van den Eynde, B.J. and van der Bruggen, P. (1997) T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 684-693.
- van Oijen, M.G., van de Craats, J.G. and Slootweg, P.J. (1999) p53 overexpression in oral mucosa in relation to smoking. *J Pathol*, **187**, 469-474.
- Venables, J.P. (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*, **64**, 7647-7654.
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Rijksen, G. and Vroom, T.M. (1997) Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol*, **183**, 195-203.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R., Lippman, S.M. and Hong, W.K. (1993) Head and neck cancer. *N Engl J Med*, **328**, 184-194.

-
- Walther, E.K., Dahlmann, N. and Gorgulla, H.T. (1993) Tumor markers in the diagnosis and follow-up of head and neck cancer: role of CEA, CA 19-9, SCC, TK, and dTTPase. *Head Neck*, **15**, 230-235.
- Wulfkühle, J.D., Liotta, L.A. and Petricoin, E.F. (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 267-275.
- Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. and St George-Hyslop, P. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature*, **407**, 48-54.

8. Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional, zwei-dimensionale Gelelektrophorese
7-AAD	7-Actinomycin D
α	anti
AK	Antikörper
allo-AMIDA	allogene Variante der AMIDA-Technologie
AMIDA	auto-antibody mediated identification of antigens
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AS	antisense
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUX	Hilfsdomäne
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
Chr.	Chromosom
CK	Zytokeratin
CMV	Cytomegalovirus
CTA	Cancer-Testis Antigen
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythriol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EpCAM	<i>epidermal cell adhesion molecule</i>
ESS	<i>Exon-Spleiß-Silencer</i>
exp.	experimentell
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HNO	Hals-Nasen-Ohren
hnRNP	<i>heterogeneous ribonucleoprotein</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
i.e.	<i>id est</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPG	immobilisierter pH Gradient
ISE	<i>Intron-Spleiß-Enhancer</i>
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
Kat.Nr.	Katalog Nummer
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Ktrl. siRNA	Kontroll <i>small interfering RNA</i>
l	Liter
LB	Luria Broth
LKM	Lymphknotenmetastase
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
m	milli
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-ToF	Matrix-unterstütztes Laserdesorptions-/Ionisations-Massenpektrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid

Mw	Molekulargewicht
NAA	natürliche Autoantikörper
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pl	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
qRRM	quasi-RNA-Erkennungs-Motiv
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde
S	sense
S/N	Signal-zu-Rauschen-Verhältnis
SCC	<i>squamous cell carcinoma antigen</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEREX	<i>serological identification of antigens by recombinant expression cloning</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STA	<i>Shared tumor antigens</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
TA	Tumorantigen
theor.	theoretisch
TNM	Tumorstadien, T bezieht sich auf die Tumorgroße, N auf den Lymphknotenbefall und M auf Fernmetastasen
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt

WHO	Weltgesundheitsorganisation
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

9. Danksagung

Die Durchführung dieser Arbeit hat mir dank einer sehr guten Betreuung und einer einzigartigen Arbeitsgruppe sehr viel Freude bereitet und ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler und Prof. Dr. Stephan Lang für die Vergabe des Themas, Hilfe und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen,

Herrn Dr. Olivier Gires für die perfekte Betreuung, stets offene Ohren und seine motivierende und menschliche Art,

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für die Übernahme der Rolle des Doktorvaters,

Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus für die guten Arbeitsbedingungen in der HNO-Forschung und allen „Klinikern“ für die Beschaffung von Primärmaterial,

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und allen „GSFlern“ für Anregungen und Kritik in Seminaren, Herrn Dr. Thomas Knöfel für Hilfe und Ratschläge bei größeren und kleineren MALDI-Problemen,

der gesamten Arbeitsgruppe für das einzigartige Arbeitsklima und die vielen guten Ratschläge und netten Gesten, die mich in anstrengenden Zeiten wieder aufmunterten. Herrn Dr. Markus Münz und Dorothea Maetzel möchte ich für die vielen Diskussionen danken, Piri Mack für die Unterstützung bei „Immunhisto und In situ“, Bärbel Schmitt für die Übernahme der Zellpflege während des Urlaubs und die vielen Gespräche im Kaffee-Kuschel, Cuong Kieu für viele Maxipräps und seine tatkräftige Unterstützung, Barabara Gonzalez, die seit kurzem das Labor erheitert und bereichert, Martin Ahlemann und Frau Dr. Tina Schaffrik für die gute Zusammenarbeit bei allo-AMIDA.

Abschließend möchte ich ganz speziell meinen Eltern und meiner Schwester danken, ohne deren immerwährende Unterstützung dieser lange Weg bis hierhin überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Herzlichen Dank meiner Freundin Nora Assenmacher für Geduld, Zuversicht und ihre liebevolle Unterstützung.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Jens Rauch
Geburtsdatum	15. 09. 1975
Geburtsort	Volkmarsen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig
Wohnort	Tutzinger Str. 2 81369 München

Schulbildung / Studium

1982 - 1985	Grundschule an der Limesstrasse, Neuaußing
1985 - 1986	Grundschule an der Kleinfeldstrasse, Germering
1986 - 1995	Max-Born-Gymnasium, Germering Schulabschluß: Allgemeine Hochschulreife Gustav-Born-Stiftungs-Preis für die Facharbeit „Die modellmäßige Darstellung der Proteinbiosynthese“ im Rahmen des Biologie-Leistungskurses
1996 - 2001	Studium der Biochemie, Universität Leipzig
2000	ERASMUS-Student an der Cardiff University, Wales
2001	Diplomarbeit am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger. Thema: „Proteomanalyse von Neuroblastomazellen“
2002 - 2006	Doktorarbeit in der HNO-Forschung, LMU München in der Arbeitsgruppe von Dr. Olivier Gires

Berufstätigkeit

Oktober 2001 bis Juli 2002	Angestellter bei IMGM Laboratories GmbH, Martinsried
----------------------------	--